disease susceptible individuals.

## METHODS AND REAGENTS FOR HLA DRBETA DNA TYPING

Publication number:	JP6505625 (T)			Also published as
Publication date:	1994-06-30			D JP3643375 (B2)
Inventor(s):	ERLICH HENRY A [US]; BEGOVICH TEODORICA [US]; GRIFFITH ROBE STEPHEN J [US]; APPLE RAYMON	ERT L (UŠ	US]; BUGAWAN ]; SCHARF	図 WO9210589 (A1) 図 ES2115667 (T3)
Applicant(s):	HOFFMANN LA ROCHE [CH]			型 EP0514534 (A1)
Classification:				EP0514534 (B1)
<ul><li>international:</li><li>European:</li></ul>	<b>C12Q1/68; C12Q1/68;</b> (IPC1-7): C12C12Q1/68M4	2Q1/68		DK514534 (T3) DE69129192 (T2)
Application number:	JP19920502862T 19911206			CA2075037 (A1)
	US19900623098 19901206; WO199	1US09294	4 19911206	② CA2075037 (C) ③ AU9136191 (A)
Abstract not available	e for JP 6505625 (T)			<< less
	nding document: WO 9210589 (A1)			
Primers for amplifications are secuences of the secuences of the secuences.	ion of specific nucleic acid cond exon of HLA DRbeta	Richt Type Paties	ru.	Fridas
sequences contained	dentifying polymorphic in the amplified DNA can be	CHCIP/masseries		
	r typing homozygous or es from a variety of sources and	\$HOLDER		
	ariants not distinguishable by	Office a sping		
	This HLA DRbeta DNA typing	DAE Parqs Also boostly theorygo	THE THE PART A RIVE TOOL & 1430	
and rapid to perform,	n a dotblot format that is simple produces detectable signals in	Van Jameyal jasterekky Eistlick 2000	O'Ul Piene Ont & 1+15	
	used for tissue typing,	skildti.		
determining muwuua disease suscentible i	l identity, and identifying	land subsect		

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

CONTRACTOR (Ve20450468) Westernay American Contract Co

#### Family list

Approximately 341 application(s) for: JP6505625 (T)

# Probe groups for the detection of nucleotide variations and genetic polymorphisms.

Inventor: ERLICH HENRY ANTHONY; SAIKI

Applicant: CETUS CORP [US]

RANDALL KEICHI (+2)

EC: C07K14/705B28; C12Q1/68B6; (+3)

IPC: C07K14/74; C12Q1/68; C07K14/435; (+3)

Publication info: AT73502 (T) - 1992-03-15

### Means for amplifying nucleic acid sequences.

Inventor: MULLIS KARY BANKS EC: B01L7/00D; C12Q1/68D4 Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]

IPC: B01L7/00; C12Q1/68; C40B40/06; (+9)

Publication info: AT83505 (T) — 1993-01-15

## Kit for use in amplifying and detecting nucleic acid

sequences.

Inventor: MULLIS KARY BANKS; ARNHEIM

Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]

NORMAN (+4)

EC: B01L7/00D; C07K14/805; (+3)

IPC: B01L7/00; C07K14/805; C12N15/10; (+13)

Publication info: AT84822 (T) - 1993-02-15

## CHARACTERIZATION AND DETECTION OF SEQUENCES

ASSOCIATED WITH AUTOIMMUNE DISEASES

Inventor: ERLICH HENRY A [US] ; HORN

Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]

GLENN T [US]

EC: C12Q1/68M6; C07K14/705B28; (+1)

IPC: G01N33/53; A61K38/00; A61K39/395;

(+19)

Publication info: AT106454 (T) - 1994-06-15

## Process for detecting specific nucleotide variations and

genetic polymorphisms present in nucleic acids and kits therefor

therefor.

Inventor: ERLICH HENRY ANTHONY [US]; SAIKI RANDALL KEICHI [US] (+2)

Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]

EC: C07K14/705B28; C12Q1/68B6; (+3)

IPC: C12N15/09; C07K14/74; C12Q1/68; (+6)

Publication info: AT125307 (T) — 1995-08-15

#### **6** Detection of viruses by amplification and hybridization.

Inventor: SNINSKY JOHN JOSEPH [US]; KWOK Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]

SHIRLEY LEE [US] (+1)

EC: C12Q1/70B6; C12Q1/70; (+1)

IPC: C12Q1/68; C12Q1/70; G01N33/569; (+7)

Publication info: AT127857 (T) - 1995-09-15

#### **PURIFIED THERMOSTABLE ENZYME**

Inventor: GELFAND DAVID H [US]; STOFFEL

Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]

SUSANNE [US] (+2)

EC: C12N9/12B7B7; C12N9/12B7B49; (+2)

IPC: C12N15/09; C11D3/386; C12N1/21; (+15)

Publication info: AT135741 (T) — 1996-04-15

## **S** METHOD FOR HLA DP TYPING

Inventor: ERLICH HENRY A [US]; HORN

Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]

GLENN T [US] (+2)

EC: C12Q1/68M4

IPC: C12N15/09; A61K39/00; A61K49/00; (+14)

Publication info: AT140035 (T) - 1996-07-15

#### 9 HIGH TEMPERATURE REVERSE TRANSCRIPTASES

Inventor: GELFAND DAVID H [US]; MYERS

Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]

THOMAS W [US]

EC: C12N9/12B7B7; C12N9/12B7B49; (+2)

IPC: C12N15/09; C12N9/12; C12Q1/68; (+5)

Publication info: AT151112 (T) - 1997-04-15

Apparatus and method for performing automated

10 amplification of nucleic acid sequences and assays using

heating and cooling steps.

Inventor: JOHNSON LARRY JAMES [US];

Applicant: PERKIN ELMER CORP [US]

LEATH RICHARD ALAN [US] (+4) EC: C07H21/00C4; B01J19/00C; (+1)

IPC: C12N15/09; B01J19/00; B01L7/00; (+23)

Publication info: AT152529 (T) - 1997-05-15

Purified thermostable enzyme and process for amplifying,

11 detecting, and/or cloning nucleic acid sequences using said enzyme.

Inventor: ERLICH HENRY ANTHONY [US];

Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]

HORN GLENN [US] (+5)

EC: C12P19/34; C12N9/12B7B7; (+1)

IPC: C12N9/12; C12N9/96; C12N15/09; (+14)

Publication info: AT154072 (T) - 1997-06-15

12 METHODS AND REAGENTS FOR HLA DRBETA DNA TYPING

Inventor: ERLICH HENRY A [US]; BEGOVICH

Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]

ANN B [US] (+4)

EC: C12Q1/68M4

**IPC:** C12Q1/68; C12Q1/68; (IPC1-7): C12Q1/68

Publication info: AT164630 (T) - 1998-04-15

13 Process for amplifying nucleic acid sequences.

Inventor: MULLIS KARY BANKS [US]

Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]

EC: C12N15/10; B01L7/00D; (+2)

IPC: C12N15/09; B01L7/00; C07K14/805; (+14)

Publication info: AT165869 (T) — 1998-05-15

RECOMBINANT EXPRESSION VECTORS AND PURIFICATION

14 METHODS FOR THERMUS THERMOPHILUS DNA **POLYMERASE** 

Inventor: GELFAND DAVID H [US] ; LAWYER

Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]

FRANCES C [US] (+1)

EC: C12N9/12B7B7; C12N9/12B7B49; (+2)

IPC: C12N15/09; C07H21/04; C12N1/21; (+16)

Publication info: AT169337 (T) — 1998-08-15

THE REDUCTION OF NON-SPECIFIC AMPLIFICATION

15 **DURING IN VITRO NUCLEIC ACID AMPLIFICATION USING MODIFIED NUCLEIC ACID BASES** 

Inventor: SNINSKY JOHN J [US] ; GELFAND **DAVID H [US] (+1)** 

Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]

EC: C12N9/12B7B49; C12Q1/68D2A; (+1)

IPC: C12N9/00; C12N9/12; C12N15/09; (+10)

Publication info: AT176002 (T) — 1999-02-15

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11)特許出票公表番号 特表平6-505625

第1部門第1区分

(43)公表日 平成6年(1994)6月30日

(51) Int.Cl.<sup>3</sup>
C 1 2 Q 1/68

FΙ

(21)出願番号 特顯平4-502862

(86) (22)出願日 (85) 郵訳文提出日 平成3年(1991)12月6日 平成4年(1992)8月6日

(86) 電際出願番号

PCT/US91/09294 WO92/10589

(87)國際公開番号 (87)國際公開日

平成4年(1992)6月25日

(31) 優先精主張番号 623,098

400 000

(32)優先日

1990年12月6日

(33)優先権主張国

米国 (US)

(81)指定菌

EP(AT, BE, CH, DE,

DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, N

L, SE), AU, CA, JP, US

審查請求 未請求 予備審查請求 有 (全 25 頁)

(71)出願人 エフ・ホフマン ー ラ ロシューアーゲ

スイス国シーエイチー4002 パーゼル グ レンツアーヘルストラッセ 124

(72)発明者 アーリッヒ, ヘンリー エイ.

- .

アメリカ合衆国94602 カリフォルニア州

オークランド、ローダ アベニュー 3936

(72)発明者 ペゴビッチ、アン ビー、

・アメリカ合衆図94350 カリフォルニア州 エル セリト、ロックウェイ アベニュー 7306

(74)代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

### (54) 【発明の名称】 HLA DRBのDNAタイピングのための方法および試薬

#### (57)【要約】

IILA DR 月遺伝子第二エクソンの特異的核酸配列の増格 用プライマーおよびその増幅されたDNA 中に含有される 多形配列の固定用プロープを、様々な超源のホモ接合体 またはヘテロ接合体サンプルの型の判定および血清学的 方法では職別できない対立遺伝子変異体の検出に使用で きる。このHLA DR B DNAの型判定システムは、実施が迅 速かつ簡便で、分単位で検出可能なシグナルを生成する ドットプロットフォーマットに使用できて、組織の型の 判定、遺体の同一性の決定、および疾患への感受性の同 定に応用できる。

DRBI テイプバ	<b>ナー</b> ジ アローブ
189-5	. 1 2 3 4 3 5 7 1 5 12 13 13 13 14 15 15 15 15 15 15 15 15 15 15 15 15 15
cumil dibrares	. (2
CHILITING	
ORDINA TERM	
ORGITORI Alla positify Helevity	DOOR SHOWS CORE EXPLICATION
CAME LACKET	(Fig. 488) (162 s (eq.)
OF BUTCHON	
OMERCIES .	
DC31*0+14-104441	
OUR LEVENSHIE	
Was borned the mending	C DRD1 abuse Section 5 section 5
Perfect of the Leading States of the Control of the	at 0140 page 440 4 page

#### 請求の領囲

- 1. サンプル中の核酸のORB OHA配を決定するための方法において、
- (a) DRB 遺伝子第二エクソンを含有するサンプル中の任意の核酸を増掘し、
- (b) 工程(d) ご増縮された上記株績を第一のパネルのオリゴタクレオチドブローブと、これらのプローブが10タクレオチド長を越える正確に抱荷性の配列とのみハイブリダイズするような条件下にハイブリダイズさせ、
- (c) DHS 遺伝子第二エクソンの配列を含有するサンプル中の核酸の特異的サブセットを増縮し、
- (d) 工程(e) で増幅された上記林散を第二のパネルのオリゴヌクレオチドブロープとこれらのプローブが10ヌクレオチド長を越える正確に相補性の配列とのみハイブリダイズするような条件下にハイブリダイズさせ、ついで
- (a) 工程(b)および(d) におけるブローフハイブリタイゼーションのパターン からサンブル中のMG (MAの由来する所で選長子展長決定する。 工場からなる方法
- 2. 工程 (e)および(e) の増幅は、一対のオリゴヌクレオチドブライマーを用いてポリメラーゼ連続技術によって行い、工程 (e)において用いられるプライマー対は工程 (e)において用いられるプライマー対とは異なる「無求項1」記録の方法
- 3. 工程 (a)において用いられるプライマーは GH46 および GH50 であり、工程 (c)において用いられるプライマーは GH46 および CRX37 または GH48 および CRX37 または GH48 および CRX30いでれかである「資文項2」記載の方法
- 4. オリゴヌクレオチドプロープの第一および第二のパネルはそれぞれ2種単 たは2種以上のプローブからなり、これらのプローブは886連位子第二エクソン 配列にハイブリダイズし、これらの配列はアミノ散残差8~16. アミノ観残差25 ~34. アミノ磁残差67~74. およびアミノ散残差88をコードする配列からなる群より選ばれる「諸求項1」記載の方法
- 5. オリゴヌクレオチドプローブの第一のパネルは、プローブ CRX80 (SEQ 1D NO:79), GH105 (SEQ 10 NO:91), GH104 (SEQ 10 NO:80), GH69 (SEQ 10 NO:57), CRX98 (SEQ 1D NO:61), GH122 (SEQ 1D NO:93), CRX23 (SEQ 1D NO:68), CRX35 (SEQ 1D NO:

(SEQ 10 NO:73)、プローブ CRX60(SEQ 10 NO:79)、6H105(SEQ 10 NO:97)、6H104 (SEQ 10 NO:90)、6H59(SEQ 10 NO:67)、CRX06(SEQ 10 NO:81)、6H122(SEC 10 NO:93)、CRX23(SEQ 10 NO:68)、CRX35(SEQ 10 NO:71)、CRX48(SEQ 10 NO:74)、6H102 (SEQ 10 NO:89)、6H111(SEQ 10 NO:92)、CRX34(SEQ 10 NO:70)、CRX14(SEQ 10 NO:70)、CRX04(SEQ 10 NO:60)、GR66(SEQ 10 NO:86)、CRX38(SEQ 10 NO:84)、 赤まび CRX12(SEQ 10 NO:63) からためる群より選ばれる2種味だはそれ以上のオリゴタクレオチドプローブ、ならかにプロープ6H125(SEQ 10 NO:94)、CRX50(SEQ 10 NO:68)、CRX53(SEQ 10 NO:76)、CRX16(SEQ 10 NO:84)、CRX60(SEQ 10 NO:86)、CRX53(SEQ 10 NO:76)、CRX16(SEQ 10 NO:80)、CRX61(SEQ 10 NO:80) CRX61(SEQ 10 NO:80) CRX61(SEQ 10 NO:80) CRX61(SEQ 10 NO:80) CRX61(SEQ 10 NO

- 11、 プライマー GHA8 (SED 1D MO:87)、GH50 (SED 1D MO:58)、および CRC37 (SED 1D MO:73)、プロープ CRC80 (SED 1D MO:78)、GH105 (SED 1D MO:91)、GH104 (SED 1D MO:90)、GH59 (SED 1D MO:57)、CRX08 (SED 1D MO:86)、GH22 (SED 1D MO:93)、CRX23 (SED 1D MO:56)、CRX35 (SED 1D MO:71)、CRX49 (SED 1D MO:74)、GH102 (SED 1D MO:88)、GRX35 (SED 1D MO:71)、CRX49 (SED 1D MO:74)、GH102 (SED 1D MO:88)、CRX68 (SED 1D MO:88)、CRX68 (SED 1D MO:88)、CRX68 (SED 1D MO:88)、TO CRX12 (SED 1D MO:88)、TO CRX68 (SED 1D MO:88)、CRX68 (SED 1D MO:88)、CRX68 (SED 1D MO:88)、CRX63 (SED 1D MO:86)、CRX15 (SED 1D MO:86)、CRX62 (SED 1D MO:88)、CRX63 (SED 1D MO:88)、CRX64 (SED 1D MO:88)、CRX63 (SED 1D MO:88)、CRX64 (SED 1D MO:88)、CRX65 (SED 1D MO:87)、CRX64 (SED 1D MO:88)、CRX63 (SED 1D MO:87)、CRX61 (SED 1D MO:80)、GH64 (SED 1D MO:86)、CRX65 (SED 1D MO:77)、CRX57 (SED 1D MO:78)、SACUCXX12 (SED 1D MO:83) からなる第二のパネルのオリゴタクレオチドプロープからなる 「賴求項10」配義のキット
- :2. サンブルが 0R1,0R2,0R4,0R7,DRx6,および 0Rx10タイプからなる群より著はれる血清型の0R81対立遺伝子からの核酸からなるか否かを決定する方法において、
- (a) サンプル中のORBF核酸を増幅し、ついて
- (b) 工程(a) で増幅された上記核験をオリゴヌクレオチドブローブのパネルと、 これらのプローブが10ヌクレオチド長を越える正確に掲稿性の配列とのみハイブ リタイズするような条件下にハイブリダイズさせ、この場合上記プローブはBRB1 通伝予第二エクソンのアミノ酸残益9~16をコードする単特の多形配列はハイブ

71)、CRX49 (SEO 10 NO:74)、GH102 (SEO 10 NO:89)、GH111 (SEO 10 NO:92)、CRX34 (SEO 10 NO:70)、CRX04 (SEO 10 NO:60)、GH56 (SEO 10 NO:88)、CRX68 (SEO 10 NO:84)、および CRX12 (SEO 10 NO:83) からなる群より選ばれる2種数だはそれ以上のプローブからなる「興味項4」配数の方法

- 6. オリゴスクレオチドプローブの第三のパネルは、プローブ GH125(SE0 10 NO:84), CRX59(SE0 10 NO:64), CRX53(SE0 10 NO:77), CRX57(SE0 10 NO:78), および CRX12(SE0 10 NO:83) からなる群より選ばれる2種またはそれ以上のプローブからなる「鶴吹項4」記載の方数
- 7. 工程(のにおいて用いられるプライマーは GH49 (SEQ 10 NO:67) および GH60 (SEQ 10 NO:68) であい、工程(のにおいて用いられるプライマーは GH48 および CRX37 (SEQ 10 NO:73) であり、大リコスクレオチドプロープの第一のパネルはプロープ CRX60 (SEQ 10 NO:73) であり、オリコスクレオチドプロープの第一のパネルはプロープ CRX60 (SEQ 10 NO:73) 。GH106 (SEQ 10 NO:91) 。GH104 (SEQ 10 NO:60) 。GH89 (SEQ 10 NO:65) 。GRX60 (SEQ 10 NO:65) 。GH22 (SEQ 10 NO:66) 。GH23 (SEQ 10 NO:66) 。GRX23 (SEQ 10 NO:70) 。GRX64 (SEQ 10 NO:60) 。GH86 (SEQ 10 NO:60) 。GH68 (SEQ 10 NO:60) 。GH70 (SEQ 10 NO:60) 。GH70 (SEQ 10 NO:60) 。GH70 (SEQ 10 NO:60) 。GH70 (SEQ 10 NO:85) 。CRX63 (SEQ 10 NO:60) 。GH64 (SEQ 10 NO:85) .CRX63 (SEQ 10 NO:60) .GH64 (SEQ 10 NO:85) .CRX63 (SEQ 10 NO:60) .GH64 (SEQ 10 NO:85) .CRX63 (SEQ 10 NO:60) .GH64 (SEQ 10 NO:60) .G
- 8. オリゴヌクレオチドブローブの第一および第二のパネルは関体支持体に固定し、各プローブは上記支持体上の分離した別番の位置に配置させる「護求項1」 記載の方法
- 9, 工程(d)および主程(d)において用いられるプライマー、ならびにオリゴ ヌクレオチドブローブの第一および第二のパネルからなる「調求項2」記憶の方 法を実践するためのキット
- 10. プライマー GH48(SEQ 10 NO:67) 、GH60(SEG 10 NO:68)、および CRX37

#### リダイスする方法

- 13. 唯福工程はプライマーGH48およびGH50とのポリメラーゼ週期反応によって 行い、プロープのパネルは GRX60 (SEQ 10 M0:70)、GH105 (SEQ 10 M0:91)、GH104 (SEQ 10 M0:90)、GH66 (SEQ 10 M0:67)、CRX08 (SEQ 10 M0:81)、GH122 (SEQ 10 M0: 93)、CRX23 (SEQ 10 M0:66)、CRX36 (SEQ 10 M0:71)、CRX46 (SEQ 10 M0:74)、GH102 (SEQ 10 M0: 89)、GH111 (SEQ 10 M0:92)、CRX34 (SEQ 10 M0:70)、CRX04 (SEQ 10 M0:83) (SEQ 10 M0:89)、CRX68 (SEQ 10 M0:84)、および CRX12 (SEQ 10 M0:83) か うなる別より遊ばれる2側またはそれ以上のプロープからなる「陳文頂12」記載 の方法
- 14. サンプルが対立適屈子0101.0102,0103,0301,0302,0401,0402,0403,0404,0406,0406,0406,0407,0408,0701,0801,0802,0803,0901.1001.1101,1102,1103,1104,1201,1301,1302,1303,1401,1402,082,087PE( からなる群より選ばれるの86(対立遺伝子からの核酸を含有するか否かを決定し、その核酸が由来する対立適伝子を決定する方法において、
  - (a) サンブル中のDRBT核酸を増<mark>築し、</mark>ついで
- (b) 工権(a) ご増幅された上記核数をオリゴヌクレオチドプローブのパネルと、 これらのプローブが10メクレオチド長を越える定ಡに根補性の配列とのみハイブ リダイスするような条件下にハイブリダイスさせる方法
- 15. オリゴヌクレオチドプロープのパネルは、プロープCRXO4(5E) 18 N0:80)、CRXO8(5E) 10 N0:81)、CRX16(5E) 10 N0:66)、CRX34(5E) 10 N0:70)、CRX36(5E) 10 N0:71)、CRX48(5E) 10 N0:70)、CRX36(5E) 10 N0:71)、CRX48(5E) 10 N0:70)、CRX68(5E) 10 N0:80)、CRX68(5E) 10 N0:80)、CRX68(5E) 10 N0:80)、CRX68(5E) 10 N0:80)、CRX68(5E) 10 N0:80)、CRX68(5E) 10 N0:80)、GH3(5E) 10 N0:87)、GH102(5E) 10 N0:80)、GH105(5E) 10 N0:80)、GH105(5E) 10 N0:80)、GH111(GE) 10 N0:80)、GH122(5E) 10 N0:80)、GH2(5E) 10 N0:90)からなる群より選ばれると概まだほぞれは上のプローブからなる「熱味項14」記載の方法
- 16、オリゴヌクレオチドプローブのパネルは、プローブCRX04(SEQ 10 MO:60)、 CRX06(SEQ 10 MO:61)、CRX16(SEQ 10 MO:64)、CRX23(SEQ 10 MO:66)、CRX34(SEQ 10 MO:70)、CRX36(SEQ 10 MO:71)、CRX49(SEQ 10 MO:74)、CRX50(SEQ (0 MO:60)、CRX53

特表平6-505625 (3)

(SEQ 10 NO:78), CRX58 (SEQ 10 NO:77), CRX57 (SEQ t0 NO:78), CRX68 (SEQ 10 NO:79), CRX61 (SEQ 10 NO:80), CRX62 (SEQ 10 NO:81), CRX63 (SEQ 10 NO:82), CRX68 (SEQ 10 NO:84), GN54 (SEQ 10 NO:85), GN56 (SEQ 10 NO:89), GN56 (SEQ 10 NO:87), GN102 (SEQ 10 NO:89), GN105 (SEQ 10 NO:91), GN111 (SEQ 10 NO:92), GN122 (SEQ 10 NO:93), 33上之7 GN125 (SEQ 10 NO:94) 对与水池 下翻滤波形151 配配の对法法

- 17. サンブルの血溶吸散が OR10x1, OR10x160x1, DR2 OR40x4, OR40x10, OR40x13, OR40x14, OR40x15, OR3, ORx11, ORx9, ORx11, 1, ORx71, 2, ORx12, ORx8, 3, ORx13, ORx140x14, ORx10x14, ORx70, ORx8, 1, ORx8, 2, OR3, および ORx10タイプからなる對より遵定れるその血液の製を決定する方法において、
  - (a) サンブル中のCRB1核酸を増幅し、ついで
- (6) 工程(6) ご増幅された上記検討をオリゴヌクレオチドブローフのパネルと、 これらのブローブが10ヌクレオチド長を越える正確に指摘性の配列とのみハイブ リダイスするような条件下にハイブリダイズさせる方法
- 18. オリゴスクレオチドプローブのパネルは、プローブCRX04 (SEQ 18 NO:60)。 CRX06 (SEQ 10 NO:81), CRX23 (SEQ 18 NO:88), CRX34 (SEQ 10 NO:70), CRX36 (SEQ 10 NO:77), CRX49 (SEQ 10 NO:74), CRX63 (SEQ 10 NO:78), CRX63 (SEQ 10 NO:82), GH56 (SEQ 16 NO:86), GH59 (SEQ 10 NO:87), GH102 (SEQ 10 NO:89), GH105 (SEQ 10 NO:89), GH105 (SEQ 10 NO:91), GH111 (SEQ 10 NO:92), およびGH122 (SEQ 10 NO:93), からなる存より遺ばれる2種またはそれ以上のプローブからなる「開歌項17」配動の方法
- 19. オリゴヌクレオチドプローブのパネルは、プローブCRXC4(SEQ 10 MC;60), CRXC6(SEQ 10 MC;61), CRX23(SEQ 10 MC;60), CRX34(SEQ 10 MC;70), CRX35(SEQ 10 MC;71), CRX49(SEQ 10 MC;74), CRX63(SEQ 10 MC;76), CRX60(SEQ 10 MC;79), CRX63(SEQ 10 MC;74), CRX63(SEQ 10 MC;76), CRX60(SEQ 10 MC;79), CRX63(SEQ 10 MC;76), CRX60(SEQ 10 MC;79), CRX63(SEQ 10 MC;79), CRX63(SEQ 10 MC;79), CRX63(SEQ 10 MC;79), CRX60(SEQ 10 MC;79), C
- 20. A854(SE0 10 NO:93), A882(SE0 10 NO:59), A883(SE0 10 NO:59), 38259(SE0 10 NO:55), 08259(SE0 10 NO:95), 08259(SE0 10 NO:95), 08817(SE0 10 NO:73), DR830(SE0 10 NO:107), 088152(SE0 10 NO:228), CRX11(SE0 10 NO:62), およびCRX37(SE0 10 NO:73) からなる 群より運ばれるオリゴヌクレオチドプライマー

10 NO:144)、0R8203(SEC (0 NO:278)、0R8183(SEC (0 NO:239)、0R8118(SEC (D NO:194)、0R802 (SEC (0 NO:81)、0R838(SEC (0 NO:115)、0R8222(SEC (0 NO:298)、0R823(SEC (0 NO:308)、0R8133(SEC (0 NO:212)、0R6198(SEC (0 NO:274)、およてのR842(SEC (0 NO:119) からなる「陳坎珥2」記載の方法

25. サンプルが対立遺伝子0101,0102,0103,1501,1602,1503,1504,1801,1602,0301,0602,0303,0401,0402,0403,0404,0405,0406,0407,0408,0403,0401,04011,1101,1102,1103,1104,8065,1301,1302,1303,1304,1305,1401,1402,1403,1405,0701,0801,0802,0603,0804,0901,1001,1201,および1202からなる群より選ばれる0881対立遺伝子からの核数を含有するか否かを決定し、その核酸が由来する対立遺伝子を決定する方法において、

- (a) サンプル中のORB1核製を増幅し、ついで
- (b) 工程(a) で増幅された上記核酸をオリゴヌクレオチドプローブのパネルと、 これらのプローブが10タクレオチド長を越える正確に相補性の配列とのみハイブ リダイズするような条件下にハイブリダイズさせる方法
- 28. 第一のパネルのオリゴヌクレオチドプローブは、CRX33(8E0 1D M0:69), GH104(SE0 10 M0:90), GH66(SE0 1D N0:68), GH69(SE0 10 N0:87), CRX49(SE0 10 M0:74), GH102(SE0 10 N0:89), GH111(SE0 1D N0:92), CRX34(SE0 10 N0:70), GH122 (SE0 10 N0:93), CRX61(SE0 10 N0:80), CRX23(SE0 10 N0:68), CRX08(SE0 10 N0:60), GH), CRX36(SE0 1D N0:71), CRX68(SE0 10 N0:84), CRX62(SE0 10 N0:61) からなる 舞より選ばれる2種書をはそれ以上のプローブからなる「陳来項1」彩版の方法
- 27. 第二のプロープのパネルは東至のプロープのパネルから掲ばれる2種はたはそれに上のプロープがらなり、第三のパネルは大名ルは1104 (SEO 10 NO:90)。 0R863 (SEO 10 NO:140)、0R813 (SEO 10 NO:189)、CRX35 (SEO 10 NO:71)、CRX67 (SEO 10 NO:78)、CRX65 (SEO 10 NO:77)、CR8136 (SEO 10 NO:272)、OR8137 (SEO 10 NO:28)、CRX65 (SEO 10 NO:27)、の8215 (SEO 10 NO:222)、CRX60 (SEO 10 NO:27)、の8215 (SEO 10 NO:291)、およびのR8216 (SEO 10 NO:292) :CRX60 (SEO 10 NO:75)、GR126 (SEO 10 NO:94)、DR3160 (SEO 10 NO:262)、CRX62 (SEO 10 NO:61)、CRX62 (SEO 10 NO:61)、CRX63 (SEO 10 NO:63)、CRX63 (SEO 10 NO:63)、CRX64 (SEO 10 NO:63)、CRX64 (SEO 10 NO:60)、CRX16 (SEO 10 NO:64)、CRX64 (SEO 10 NO:63)、CRX64 (SEO 10 NO:63)、CRX64 (SEO 10 NO:64)、CRX61 (SEO 10 NO:64)、CRX64 (SEO 10 NO:64)、CRX61 (SEO 10 NO:64)、CRX64 (SEO 10 NO:64) (SEO 10 NO

21. 0元818 (SEQ 10 M0:97), DR820 (SEQ 10 M0:88), DR821 (SEQ 10 M0:99), DR827 (SEQ 10 M0:106), DR831 (SEQ 10 M0:108), DR832 (SEQ 10 M0:109), DR833 (SEQ 10 M0:110), DR834 (SEQ 10 M0:111), DR834 (SEQ 10 M0:111), DR836 (SEQ 10 M0:112), DR838 (SEQ 10 M0:113), DR837 (SEQ 10 M0:114), DR842 (SEQ 10 M0:118), DR846 (SEQ 10 M0:123), DR848 (SEQ 10 M0:123), DR849 (SEQ 10 M0:171), DR8103 (SEQ 10 M0:177), DR8107 (SEQ 10 M0:177), DR8107 (SEQ 10 M0:178), DR8108 (SEQ 10 M0:178), DR8108 (SEQ 10 M0:184), DR8108 (M0:184), DR8108 (M0:184), DR8108 (M0:184), DR8108 (M0:184), DR8108 (M0:184), DR8108 (M0:184

- 22. 第一のパネルのプロープは、08801 (SE010 N0:79)、5H104 (SE0 10 N0:90)、 0R848 (SE010 N0:123)、0R848 (SE0 10 N0:125)、0R8207 (SE0 10 N0:263)、6H102 (SE0 10 N0:88)、0R8208 (SE0 10 N0:285)、0R8208 (SE0 10 N0:88)、0R8102 (SE0 10 N0:178)、0R8112 (SE0 10 N0:188):0R807 (SE0 10 N0:84)、および0R842 (SE0 10 N0:189)、0R807 (SE0 10 N0:84)、および0R842 (SE0 10 N0:189)からなる時より遺ぼれる2種またはそれ以上のプロープからなる「調味項1」影響が万法
- 23. 第二のパネルのプロープは、DR8223(SE01D NO:229)、OR837(SE01D NO:144)、OR8203(SE0 1D NO:278)、DR8163(SE0 1D NO:239)、OR8118(SE0 (D NO:194)、DR802(SE0 1D NO:81)、DR858(SE0 (D NO:115)、DR8222(SE0 (D NO:238)、DR8232(SE0 (D NO:308)、DR8138(SE0 (D NO:212)、DR8198(SE0 (D NO:274)、およびDR842(SE0 (D NO:308)、DR8138(SE0 (D NO:308), DR8138(SE0 (D NO:308), DR8138(S
- 24. 工程 (a)において用いられるプライマーは CRX28 (BEQ 10 NO:87) および CRX29 (SD 10 NO:88) であり、工程 (c)において用いられるプライマーは CRX28 および CRX37 (SEQ 10 NO:73) であり、オソコスクレオチドプロープの第一のパなルはプロープのRB01 (SEQ 16 No:73)、GH104 (SEQ 16 No:90)、DR846 (SEQ 16 NO:123)、CR848 (SEQ 16 NO:125)、DR6207 (SEQ 16 No:283)、GH102 (SEQ 16 No:83)、DR820 (SEQ 16 No:84)、およびDR842 (SEQ 16 No:119) からなり、オリコスクレオチドプロープの資工のパネルはプロープのR6223 (SEQ 10 No:229)、DR837 (SEQ

CRXO8(SEQ 10 NO:61). CRX57(SEQ 10 NO:78), CRX58(SEQ 10 NO:77), CR58(SEQ 10 NO:87), およびCRX33(SEQ 10 NO:88), CRXQ4(SEQ 10 NO:80), CRXG8(SEQ 10 NO:61), CRX57(SEQ 10 NO:78), DRB181(SEQ 10 NO:267), CRX68(SEQ 10 NO:77), CH102 (SEQ 10 NO:89), CR54(SEQ 10 NO:89), CRX68(SEQ 10 NO:82), CRX36(SEQ 10 NO:77), CH102 (SEQ 10 NO:89), CR54(SEQ 10 NO:89), CRX68(SEQ 10 NO:89), CRX

28. 工程 (a)において用いられるプライマーはGR46(SEO 10 NO:67)およびGH50 (SEQ 10 MO:68)であり、工程 (c)において用いられるプライマーはA883(SEQ 10 NO:58) ZA880 (SEQ 10 NO:57), AB82 (SEQ 10 NO:58) ZAB80, A884 (SEQ 10 NO:58) とABSO. およびGH48(SEB HD HD:87)とCRX37(SED HD ND:73) からなる絆より選ば れ、オリゴヌクレオチドブローブの第一のパネルはブローブCRX33(SE0 10 NO: 69), GH104 (SEQ 10 NO:90), GH56 (SEQ 10 NO:88), GH69 (SEQ 10 NO:87), CRX49 (SEQ 10 NO:740.GH102(SEQ 10 NO:89).GH111(SEQ 10 NO:92).CRX34(SEQ 10 NO:70). GH122 (SEQ 10 NO:93), CRX61 (SEQ 10 NO:80), CRX23 (SEQ 10 NO:66), CRX06 (SEQ 10 NO:81), CRX36(SEQ 10 NO:71), CRX68(SEQ 10 NO:84), #547/CRX62(SEQ 10 NO: 81) からなる群より遺ぼれる2種またはそれ以上のブローブからなり、第二のブ ロープのパネルは第三のプローブのパネルから選ばれる2種またはそれ以上のプ ローブからなり、第三のパネルはパネルGHED4(SED 10 NO:90), DRB63(SED 10 NO: 140), DR8113 (SEQ 10 NO:189), CRX35 (SEQ TO NO:71), CRX57 (SEQ 10 NO:78), CRX58 (SEQ 10 NO:77), GR8196 (SEQ 10 NO:272), DR8197 (SEQ 10 NO:273), GR8215 (SEQ 10 NO:291). #5.ECV/DR0216(SEQ TO NO:292):CRX50(SEQ TO NO:75), GH125(SEQ TO NO: 94). DR8180 (SEQ 10 NO:256). GH122 (SEQ 10 NO:98). CRX61 (SEQ 10 NO:60). CRX23 (SEQ 10 NO:66), CRXOS (SEQ 10 NO:61), CRX62 (SEQ 10 NO: 81), CRX68 (SEQ 10 NO: 84). CRX35(SEO 10 NO:71), CRXO4(SEO (D NO:60), CRX67(SEO 10 NO:78), CRX58 (SEQ 10 MO:77), およびGH58 (SEQ 10 MO:88);CRX81 (SEQ 10 MO:80),CRX64 (SEQ 10 NO:83), CRXO4 (SEG 10 NO:80), CRX15 (SEG 10 NO:84), CRXO8 (SEG 10 NO:81). CRX57 (SEC 10 NO:78), CRX66 (SEC 10 NO:77), GH58 (SEC 10 NO:87), およびCRX33 (SEQ 10 NO:69), CRXO4(SEQ 10 NO:80), CRXO6(SEQ 10 NO:81), CRX67 (SEQ 10 NO: 78), DR8181 (SEO 10 NO:257), CRX58 (SEO 10 NO:77), GH102 (SEO 10 NO:89), GH54 (SEQ 10 NO:85), CRY63(SEQ 10 NO:82), CRX35(SEQ 10 NO:71) からなる群より選ば れる「請求項2」記載の方法

特表平6-505625 (4)

#### 5 班 世

#### HL人 ORB の DNAタイピングのための方法および試算 関連出版の相談参照

本出版は、1986年3月13日出版の現在は放棄された一連署号館 839,331号の一部継続出版である、1986年8月22日出版の現在は放棄された一連署号第 899,344 号の一部継続出版である、1989年6月15日出版、保護中の一選署号第 491,210号の一部継続出版である、1990年12月6日出版、保護中の一選書号第 623,098号の一部編集出版であり、上配各出版は参考として本明総轄に導入される。

#### 発明の背景

#### 発明の分野

本発明は、RLA CR B (CRB) 狭酸の CRAタイピングのための方法および試験に関する。本発明は、RNA または。CDRA練型からなるサンプルを含めた各種起源の水毛接合またはヘチロ接合サンプルのタイピング、および現在の血清学的、総理学的、もしくは生化学的方法では難別できない対立変異体の検出を可能にする。本発明のタイピング第は、移植組織のタイピング、個体の同一性の決定、および疾患に相無しやすい個体の向定を容易にする。したがって、本発明は、一般的に医学の分野、とくに医学的研究および診断の接頭、法科学の分野、ならびに分子生物学の分野に応用される。

#### 間濃技術の説明

HIA クラス工蛋白質 HLA OR HLA DQ. および代人 OPは、ヒト泉色体もの均断上の主要組織連合遺伝子複合体 (MiC) の遺伝子によってコードされている。クラス工蛋白質は、約3400 (繰びよび約2次) 8 観からなるヘテロダイマー細菌白質である。クラス工蛋白質は、マクロファージ、日報的、活性化工報節、および他の細胞タイプの要面上に発現した、抗算の結合およびベルバーエリン/(数への連供に関野する (Glies & Capra:Structure, function, and ganetics of the Human Class は molecules. Adv. Insunol. 37:1, 1965 参照)。さらに、クラス工蛋白質は、成熟下リン/(数に発現した工程的支替体のレバートリーを決定することにより、特質的免疫が各位影響する。相よクラス工造伝子のよび蛋白質の一般的次移は影には、frowsdele ら: "Structure, sequence and polymorphism in the HLA O region",

29. 工程 (a) において用いられるプライマーはGK48 (SEQ 10 NO:67) およびGH50 (SEO 10 NO:68) であり、工程 (c) において用いられるプライマーはA983 (SEO 10 HO:58) ZAB60 (SEO 10 NO:57), AB82 (SEO 10 NO:58) ZAB60, AB64 (SEO 10 NO:56) とA880. およびGH48 (SEQ 10 NO:67) とCRX37 (SEQ 10 NO:73) からなる群より選ば れ、オリゴヌクレオチドブローブの第一のパネルはプローブCRX33(SEO ID NO: 89). GH104 (SEQ 10 NO:90). GH66 (SEQ 10 NO:88). GH59 (SEQ 10 NO:87). CRX49 (SEQ ED NO:74), GH302 (SEO LD NO:89), GH111 (SEO LD NO:92), CRX34 (SEO LD NO:70), GK122 (SEQ [0 NO:93], CRX61 (SEQ [0 NO:80), CRX23 (SEQ 10 NO:88), CRX08 (SEQ 10 NO:81), CRX35(SEQ 10 NG:71), CRX88(SEQ 10 NO:84), #5-50/CRX82(SEQ 10 NO: 81) からなり、第二のパネルはパネルのH104(SEQ (D MO:SO), ORB63(SEQ (D MO: 140), 928113 (SEG 10 NO:183), CRX35 (SEG 10 NO:71), CRX67 (SEG 10 NO:78), CRX68 (SEQ 10 NO:77), DRB198 (SEQ 10 NO:272), DRB197 (SEQ 10 NO:273), DRB216 (SEQ 10 NO:291), #3-50/OR8216 (SEQ 10 NO:292) :CRX50 (SEQ 10 NO:76), GH126 (SEQ 10 NO: 94), QRB180 (SEQ. LD. NO: 256), GH122 (SEQ. LD. NO: 83), CRX61 (SEQ. LD. NO: 80), CRX23 (SÉQ 10 NO:66), CRX06(SEQ 10 NO:61), CRX62(SEQ 10 NO: 81), CRX68(SEQ 10 NO: 84), CRX36 (SEQ. 10. NO:71), CRX04 (SEQ. 10. NO:60), CRX67 (SEQ. 10. NO:78), CRX66 (SEQ 10 HQ:77), 35-20 GH56 (SEQ 10 NO:88); CRX61 (SEQ 10 NO:80), CRX64 (SEQ (0 HO:83), CRXO4 (SEQ. 10 NO:80), CRX15 (SEQ. 10 NO:64), CRXO8 (SEQ. 10 NO:61). CRX67 (SEG 10 NO:78), CRX56 (SEG 10 NO:77), GR69 (SEG 10 NO:87), #5-27/CRX33 (\$E0 10 NO:69), CRXO4 (\$E0 10 NO:60), CRXO8 (\$E0 10 NO:61), CRX67 (\$E0 10 NO: 78), ORB181 (SEG TO NO: 257), CRX68 (SEG TO NO: 77), GH102 (SEG TO NO: 89), GH54 (SEO 10 NO:85), CRX63(SEO 10 NO:82), CRX35(SEO 10 NO:71)からなる鮮より通ば れる「請求項2」記載の方法

30. RAPO5(SEQ 10 MO:312), およびRAPO6(SEQ 10 MO:313)からなる群より選ば わるブローブ

|maxuno|. Rev. 85:5(1985)がある。

クラスエαおよびβ鎖は別の連続子によってコードされ、BP, 80. および DR 強 伝子はその MHCの別の領域に位置する。OR領域では、単一の DRA連伝子座、また は遺伝子は非多形BR 企業をコードするが、DR81, DR82(DR88ともいわれる), DR83, DRB4、および DR85 と命名されたらつの角なる DR8遺伝子座が多形DR B 鍵をコードする。一部の遺伝子座はある種のハロタイプ上にのみ存在し、だとえば DR2ハロタイプ上DR85)、さらに発現される DR8遺伝子の数もハロタイプ間で変勢する (80hasら:HLA-DRData genes vary in number between different DR-specificities, whereas the number of Objata sensa is constant, J immunoi, 135:2148, 1996を解》。

(例定された明らかに異なるDR81対立遺伝子の数は増加を続けている。 HL系版 子についての WHの名委員会からの1989年報告では、34の明らかに真なるDR81対 立選伝子が同定された。これらの対立遺伝子によって、血清学的DRを異性 DR1~ DRv18 が現れるものと考えられている(PHOか名委員会による "Nozenc lature for factore of the HLA system 1989"と履する文献、Immunosenatics 31:313-140. 1990参照。参考として本明純書に導入する)。1890年の報告までに、販賞された DR81対立遺伝子の数は45にまで上った(WHOか名委員会による "Nozenc lature for factore of the HLA system 1990"と履う本文献、Immunosenatics 33:303-309. 1891参照、参考として本明続書に導入する)。本発明は、数葉の断点に発見され だ対立遠伝子の配列を提供するものである。

OR82遺伝子編(現在はOR82遺伝子座と呼ばれる)の対立遺伝子は、OR1, DR2, お よびORw10 ハロタイプ上に存在し、見掛け上発現されない (Erlichら: Analysis of isotypic and erlotypic sequence veriation in the HLA CR8 region using the in vitro enzymatic applification of specific ONA segments. \*Immunology of HLA\*, Ougant 編、Springer-Verlag, New York, 1991 年刊参照)。

0R63遺伝子座の対立遺伝子は、スーパータイプ特異性DRw62 (ORw52a, ORw52b, あ よCFORw52c) をコードレ、OR3, ORW6, ORW11, ORW12, ORW13, ORW14, ORW17, ならびに ORW18 ハロダイブ上に存在する。

単一対立運伝子を育するORB4選伝子座はDRw53 スーパータイプ特異性をコード し、DR4,DR7,およびDRw9ハロタイプ上にのみ存在するOkatsuyana今:Structurs! relationships between the DRbetal and DRbetal subunits in DR4, 7, and we halotypes and the DRw63のT3) specificity. J.izmuno!, 137:934, 1986参照]。
ORB5遠伝子笛の対立遠伝子は DR2八〇タイプ上にのみ存在する (Analysis of isotypic and allotypic sequence variation in the MLA ORB region using

the in vitro enzymatic applification of specific がA segments. 的出)。 クラスIDR抗原(鎌白貨)の多形は現在、経確場から得られたアロ血液を用い、 特割はリンパは上微量純粒循管試験で分類されている。また、さらに細かい裕異

特別はリンパ球上微量純約簡智試験で分類されている。また、さらに細かい神典性によるタイピングを可能にし、アロ反応性下初数クローンの特質性、または下 和時把要体の水モ混合タイピング和間(kTC) による刺激に対する推発応答に基づ く、約数タイピングプロトコールが開発されている。

これらの超越ペースの分析では、さらに血清等のに定義される多くの抗原、たとえばDR4 の6つの併サプタイプに紹分模されるDa特別性が定義される (Cairns ら: Sequence polymorphisa of MLA DR B | alieies relating to I cell recognized deternicants. Nature 317:103, 1986 参照)。しかしながら、血液学的および超越性いずれのアッセイ操作も困難で、時間がかかる。別限フラグメント長多形(BRLP)に基づくDRA ダイビングプロコトールも再変されている(米国特許据 4.582,783号参照、この記載は参考として本明起籍に導入する)。しかしながら、これらのRRLPに確づく分析は大量の高分子量のMA を必要とし、集中的な分かる変更し、一方、有益な利取酵素の数が残られているので、得られる結果に限点がある。

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR) の出現は、複雑なグノムDM, の分析および操作を 簡素にした。PCR 法は、核酸のされめて複雑な混合物に出発して、特異的な核酸 の増塩を可能にし、米国特許第 4,883,195号、 4,683,202号、 4,888,818号、お よび 4,985,188号、ならびに欧州特許公告第237,362 号に詳細に記載されている。 これらの記載は参考として本明報書に導入する。

PCR 法はまた、個体のクラスエ HLA DMAのタイピングを容易にする。科学者らは、オリゴヌグレオチドプライマーを設計し、これらのプライマーを興味のある配列の増幅に用いることにより、ゲノムのML における DRS遺伝子窩の多形の第二エクソンを検討してきた(Scharfら: Hox Indusol., 22: 81, 1988 の"Sequence analysis of the HLA DRB and HLA DQB loci from three Peophigus vulgaris

patients' と思する論文参照)。

POR プライマーが制限酵素に関配列を含有する場合は、増幅されたONA はシーケンシングベクターに直接クローン化することが可能で、増幅生成物の又クレオチド配列を容易に決定できる(Scharifo: Hum. Emaunol., 233:1076, 1988における "Oifect cloning and sequence analysis of enzymatically amplified generic sequence" と題する情文参照)。

増縮DNA はまた、配列特質的オリゴタクレスチド(980) プローブを使用する検 出方法によっても検討できる (Sakiら:Nature 324:18, 1888 による"Analysis of enzysatically smplified beta-globin and HLA OQaioha DNA with allele-specific alignucleotide probes" と乗びる論文参照)。

これらの進歩にもかかわらず、MLA OR 8 遺伝子の複雑さにより、僧体のMLA OR B OKAタイプを決定するための有益かつ効率的な手段の開発は妨げられてきた。本発明は、効率的かつ有益なOR B OKAタイピング法の要求に合致する新規な方法および試験を提供するものである。一方、これらの新規な方法および試験は、これまご知られていなかったOR B 遺伝子座の発見をもたらし、さらにこれらの遺伝子座は本発明の方法によって分類、同定することができる。

本角明のタイピングシステムは、aRNAから合成されたcDNAのタイピング、なら びに追議、トランスジェニックシステム、病的状態および細胞系における DRB途 伝子の発現のタイピングおよび研究に使用できる。DR抗原を発現しないが、また は異常な血清活性を示す細胞、たとえば腫瘍細胞も、容易にタイピングできる。 しかも、異常な環境のサンブル、たとえば古代のDNA、や法科学サンブルで、EDA か分解していたり、きわめて微量しか分析に使用できなくても、似の判定が可能 である。

PCR は傾めDMA のフラグメントを百万倍にも増幅できるので、また本駒明のシスチムは PCR発生複数を使用するので、放射模倣プロ〜プを使用する必要がなく、 西洋ウサビベルオキシダーゼ(HRP) に共有総合させた非同位元素SSO で十分な検 出態度が得られる。本発明の特異的に結合した HRP 模様プローブの存在は、発島 性染料または化学光光性基質による単純なドットプロットフォーマットにより、 分単位の速度で、検出できる。

#### 発明の要約

図4は、UR4 血液学的特異性で絶換系数サブダイブに分類するための HLA DR8 UNA タイピング (例5参照) の結果を示す図であり、

図5は、083,086,086, および 08v8 の特異性をサブタイプに分類するための 8人 088 09A タイピング (例6参照) の結果を示す数であり、

数6は、086型を決定するためのブローブハイブリタイゼーションの結集(例 6推奨)を達得したものであり。

※37は、多数の異なる細胞系の限よ DR8 DNA タイピング (優6 および7参照)の結果を示す図であり、

**窓8は、OR3 細胞系のHLA ORB ONA サブタイピング (例7参照)** を示す図であ い。

図9は、ヘテロ接合および他の異常なサンブルの利人 ORB DNA 型を決定するためのブローブハイブリダイセーションの結果 (例7参照) を表化したものであり、図10は、NLA ORB DNA 型を決定するためのブローブハイブリダイゼーションの結果 (例9参照) を表化したものであり、

図11、12および13は、088 対立遺伝子型を決定するためのプローブハイブリタイセーションの結果(例9 参照)を変化したものである。

#### 発明の詳細な説明・

本発明は、NA DR6 型判定システム、および DR0対立遺伝子を分析するための配別特異的オリコヌクレオチドブローブ(SSO) を提供する。本発明は、c0Nは同盟を包含する各種起想からのヘテロ接合サンプルのタイピングに使用でき、また血清学的方法では協別できない対立遺伝子変異体の検出に使用できる。このタイピングシステムは、実行が単純で迅速なドットプロットフォーマットを利用でき、検出可能なシグナルを分単位の速度でで生成さびることができ、組織のタイピングならびに設体の同一性および検患への機能しやすさの決定に価値が認められる。本発明は、NLA DR6 対立遺伝子の検出および同定の方法を提供する。健認された明分がに関係のR8 対立遺伝子の検出および同定の方法を提供する。健認された明分が自然の発展的な過去であり、この対立遺伝子セットは、本明組書においては、以下1989対立遺伝子セットと呼ぶ。1990年の 制的の名类真会からの報告には46の対立遺伝子でリトと呼ぶ。この対立遺伝子セットは以下1980対立遺伝子でリンで呼ばは分析の出て遺伝子でリンと呼ぶにとにする。本発明は、さらに7個の新念に発見

共立
本共明は、増幅および検出方法、一般的および運転子選択之は群特異的増幅プライマー、DR81遺伝子選における未知の対立連伝子の内皮ののプロープを含めた非同位元素配列特異的オリゴヌクレオチド(SS) プローブ、ならびに血海等的方法では機別できない対立遺伝子を含めて NLA DRB対立遺伝子のタイピングのための迅速、単純かつ距離な所を問題に与える方法を実施するキットを提供する。

本角羽の一級様は、サンブル中の核酸の08 B BA以降を決定するための方法において、(a) 08.6 遺伝子第二エクリンを含有するサンブル中の任意の核酸を増幅し、(b) 工理(a) で増値された上記核酸を第一のバネルのオリゴタクレオチドブローブと、これらのプローブが10ヌクレオチド及を属える正確に指摘性の配列とのみハイブリダイズでもような条件下にハイブリダイズでは、(c) DR B 遺伝子第二エクリンの配列を含有するサンブル中の特異のサブセットの核酸を増縮し、(d) 工程(d) で増幅された上記核酸を第二のバネルのオリゴタクレオチドプローブとこれらのプローブが10ヌクレオデドスを超える正確に相続性の配列とのみハイブリダイズであような条件下にハイブリダイズでは、ついた(a) 工程 (b) および(d) におけるプローブハイブリダイゼーションのパターンカラサンブル中の088 B DNAの由来する08 B 遺伝子単を決定することを提供する。

#### 図版の簡単な説明

図1は、DRB 一般的およびORB1特異的準備および検出(例2参照)の時期を示す型であり、

聞2は、0881特異的場框および検出(例2参照)の結果を示す図であり、

図3は、古典的血清型 ORT〜ORTOの HLA ORB DNAタイピング (傍3 整架) の結果を示す的であり、

された対立遺伝子の配列を提供する。

NLA クラス正確伝子座で観も高度な多形を示す DRS遺伝子篇の多様性、および 東部中でのこれらの遺伝子座における多数の対立遺伝子により、サンブル中の核 酸が由来する特定の DRS遺伝子度および対立遺伝子の同定を困難にしている。本 規則は、この決定を高い特異性をもって実備し、そのサンブルが採取された特定 の個体の固定を可能にする。さらに、この検別力は、本発明の法科学分野におけ る妨用を可能にするものである。

PCR(または他の増福方法) をさわめて少量の DNA (またば分解UNA) の増福に使用することができので、本発明は、異常な起源、たとえば口内路線、一本の毛、また保存された古代の標本のDNA のようなサンプルからのNLA DRB DNA の型の特定に使用できる。古代標本サンプルの場合には、有史以前経済のたとえば初期原入の対立違位子の分析が可能である。

本発射の方法は、ORB 遺伝子を発現しない細胞のDRB ORA 型の決定に使用できる。しかしながら、この方法はまた、DRB aRMAから含成された。DRAのDRB DRA 型の決定にも適している。この方法は、様々な細胞系表定は組織における HLA DRB の発現の研究を容易にし、 HLA DRB発現と形質転換、自己免疫、または他の健康状態に対する格受性との間に解源があるかどうかの決定に使用できる。

本典明の研究への利用可能性としては、直接的な磁床応用が明白である。NHC の遺伝子および遺伝子監視は健体の免疫学的状態に中心的役割を兼たし、特定の NHC 遺伝子産物が発生の抵抗性および感受性に隔返している。本毎明は、サンプル中のNHC DRB 遺伝子産物の満定を可能にし、本品明はまた、医学とくに医学的 経断方法の分替に適用できる。

このシステムの観別力は、拒絶さたは移植片対荷主席の危険を長小陸にするために強めて性格な HLA ORBマッチングが必須と思われる移植ドナーの型の判定に 有用である(Pollacko-L. Clin. [axunol. 3:341, 1963における "Mixed lysohocyte reactions for individuals with phenotypic identity for specific HLAB OR determinants: The role of linkage disaculilibrius and of specific DR and other Class II determinants'と関する論文参釈)。 疾患感受性に関する研究では、ORB 対立遺伝子における単一の又クレオチドの相違が医学的に重要であることが示されている (Schertら, "Specific HLA-008 and HLA-0781 alieles confer

susceptibility to Penchigus vulgaris".Proc.Nati.Acad.Sci.USA 86:215,1989 ならびに Neponら、"identification of HLA-Ow14 genes in 984+ Rhewatold Arthritis". Langst,1002 質、1988 参照)。

上述の別誌に対えて、本発明はまた、以前には知られていなかった印料立遺伝子を何定する方法、および関連プライマー、プロープ、ならびに DRB対立遺伝子の同定方法を提供する。このタイピングシステムを使用する異株パターンの 8%0 プローブハイブリダイゼーションでは、"Begult" 超路系の PMタイピングによって併示されるように (例7 参照)、新しい対立遺伝子が問定される。この網路系はDRB1運伝子第において異常パターンのプローブハイブリダイゼーションを示し、現在は12967年1133 (配別) 20 10 (27) と命名された、以前には経告されていなかった配列が明らかにされた。

関係にして、ライム病の風報のW81対立遺伝子の本発明の分析で、新しいパターンのプロープハイブリダイゼーションが明らかにされた。BR81対立遺伝子配列は最者のゲノムDNA からクローン化され、説列が決定された。患者のOR81対立遺伝子の配列は、これまでに発きされているDR81対立遺伝子とは異なり、新たに、OR1とY10 (また、DR81+1とY10)と命名された。その患者における他の対立遺伝子はDR81+0402 であった。DR7とY10 対立遺伝子は、5°未満に、M81+0801、0802、おおび#1201 に、モレで 3°未満に、14401 に類似の配列の領域を背する。本発明は、GR1とY10 対立遺伝子は、現在はDR81+1404 (SE2 (1) W1:40)と命名されている。

他の新たに発見された0881遺伝子盛の0881対立遺伝子は、表初は08°PEV'とあるされた08814305 (SEQ 10 M0:30), 088141303 (SEQ 10 M0:34), および最初は0881 48003 と命名された08814105 (SEQ 10 M0:29) である。いずれも、本発等の方法による分析が新たなパターンのプローブハイブリダイゼーションを明らかにした場合に角見された。ついで名対立遺伝子を配列分析を行ったところ、新規なハイブリダイゼーションパターンき生じる配列変異が明らかにされた。本角明は、新たに発見された対立遺伝子を他の 086対立遺伝子の分類別するためのプライマーおよびプローブを提供する。

本発酵はまた、本発明の ORBタイピング法の実施をより使利にするためのキッ

トを提供する。一種のキットは、増組およびタイピングの再試案を包含する。他のキットは、本発明の1種まだは2種以上の DR8プローブのみを包含する。いずれのキットにおいても、プローブは振騰されていてもされていなくても、また個体支持体に結合されていてもよい。プライマーをキット中に入れる場合は、接出を容易にするから、すなわち、シクナル発生試験の結合または固定化のために専業することができる。キットにはまだ、プローブハイブリダイゼーションを容易にするための試験、すなわち発色性鑑賞148 およびストレブトアビジン接合西洋ワサビベルオキシダーゼを含有させることをできる。契約すれば、本発明の方法の実施に質用な試験は、本発明の利用を促進する任意の配置でパッケージできる。の実施に質用な試験は、本発明の利用を促進する任意の配置でパッケージできる。

各対立遠伝子の第二のエクソンのヌクレオチド配列は、コードされるアミノ機配列とともに、配列指輪部に示す。以下の変1 および2には、1989対立遺伝子セットに対ける対立遺伝子の相当するヌクレオチド配列情報を、比較が存品な株式で掲げる。表1 にはまた、対立遺伝子 08940101 の核酸配列、ならびにコードされるアミノ酸配列を至文字および一文字の両コードで示す。内域に、表3 には、相当するアミノ酸配列情報を一文字コードを思いて示す。内域に、表3 には、相当するアミノ酸配列情報を一文字コードを思いて示す。の対立遺伝子の配列情度書号(SE) (0 NO) を以下に示す。DR8141603、080140303、および388141105 を除き、すべての対立遺伝子は、1980年 附の命名委員会報告(上述、1890対立遺伝子セット)に掲載されている。088141603 の配列については、088000105 号: Nac 18841031 30141-44,1981 も参照されたい。

板1、2および3に掲載されない対立遺伝子の又クレオチド脱列は、配列掲載部のほかに、以下の変りに指げる。

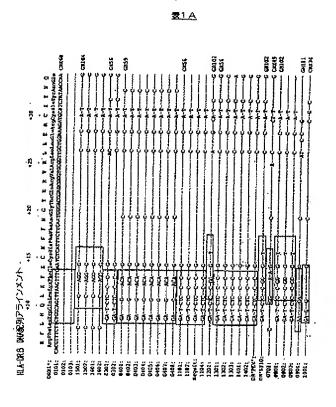
对双通位子	SEQID NO:	对立建伝子	SEO ID NO:
DRM1 0101:	\$80 ID NO: 1	DMH1+1201;	SEQ 70 NO: 30
DEB1-0105;	SEQ ID NO. 2	DRB1*1202:	8EQ 20 NO: 31
D\$UB1+0103;	seq id no; s	DRB1*1301:	3EQ ID NO: 32
DRB1*0301:	SEQ ID NO: 4	DRB1*1302:	5EO ID NO: 33
DRB1*0302;	SEQ ID NO: 5	DRB1*(303:	\$20 ID NO: 34
DRB1*0303;	3EQ 10 NO: 6	DRB1*1304;	3EQ ID NO: 35
DRB1*0401:	\$EQ ID NO: 7	DRB1*1305:	\$50 ID NO: 36
DRB1*0402;	SEQ ID NO: 1	DRB1*(401;	SEO ID NO: 37
DR#1*0403:	\$8Q EO NO: 9	DRB1*1402:	SEQ ID NO: 38
DRB1*Q4Q4;	SEQ TO NO: 10	DRB1*1403:	SEQ ID NO: 39
DRB1*0405;	SEQ 10: NO: 11	DRB1*1464:	\$80 ID NO: 40
DRB1*0406;	SEQ ID NO: 12	DRB1*1405:	SECIDNO: 41
DRB1*0407:	SEQ ID NO: 13	DRB1*1501:	SEQ ID NO: 42
DRB1*0408:	\$BQ ID NO: 14	DRB:*1502:	SEQ ID NO: 43
DRB1*0409;	SEQ ID NO: 15	DRB1*1503:	SEQ ID NO: 44
DR81*0410:	31:ON QI DS2	DRB1*1601:	5EQ (0 NO: 45
DR91*0411;	SEQ ID NO; 17	DRB1*1601;	SEQ ID NO: 46
DRB1+0701:	SEQ ID NO: 14	DRB2*0101:	SEQ ID NO: 47
DRB: *0801:	5EQ ED NO: 19	DRB3*G101;	SEC ID NO: 48
DRB1*0102:	SEO ID NO: 20	DRB3*0201:	SEO ID NO. 49
DRS1=0803:	SEO ID NO: 21	DRB3 0102:	SEQIDIO: 316
DRB1*0804:	SEQID NO. 22	DRB3*0301:	SEQ 10 NO: 50
DRB1*0901;	SEQID NO: 21	DRB4*0101:	
DR81*1001:	SEQ 10 NO: 24	DRBS*QIOL:	SEQ ID NO: 51
DR81*1101:	\$50 ID NO: 25	DRB5*0102;	SEQ ID NO: 52 SEQ ID NO: 53
DRB1+1102:	SEQ ID NO: 26	DRB5*0201:	
DRB1*1103;	SEQ ID NO: 27	DRB5*0202:	SEQID NOISA
DRB1*1104:	SEC ID NO: 28	DRAS-0204:	SECIED NO: 55
DRB1*1105:	SEO ID NO: 29		
	AAM CO 11/11/25		

以下の表1、2および3では、最近隔定された"PEV" および「LY10"対立遺伝子を除いて、すべての配例は、上述の1890年 附0 州人の名数員会報告に持載されていて、0R81中101 ヌクレオチト配列はコンセンサス配列として働く。コンセンサス配列についての推定アミノ参配列はヌクレオチト配列の上部に一および三文字コートで記載する。配列ホモロジーは横線で提供、文字は多形塩基を示す。接中のアラインメントの布牌に記載した配針 1800プロープおよびプライマーは、四角で超った配列の収載と簡一の配列であるか、またはそれと相緒性である。アラインメントの場に20つる前がある場合は、最左端の名前が景を鎖の四角に相当し、最右端の名前が最を端の四角に相当し、最右端の名前が最右端の四角に相当する。プロープCX12 は、すべての 908 対立遺伝子に示された模様にハイブリダイズされる。

A、日およびCと命名された3部からなる被1には、DR特異性 DR1~ORe18 に 相当する 35 DR81対立運転子の又クレオチド記列を示す。

数2は、DRB2、DRB3、DRB4、およびDRB5遺伝子葉の対立遺伝子についての又クレオ デド配列アラインメントを示す。DRB1対立遺伝子の配列多形の主要領域は、アミ ノ数位置 9-18、25-34、87-74、およびBBに居在し、第二のエクソン配列の残酷は比 較的不能である。

携3には、093 対立遺伝子によってコードされる推定アミノ被配列アラインメントを示す。アミノ教配列の分析から、数種の異なる対立遺伝子に見出される特定の多形配列をもつ複雑な、レガレ限定されたパターンの多形が明らかにされた。しかしながら、一部の多形配列は各対立達伝子に独特である。QR1, QR2, QR4, QR7, QR9, あよびQR41Q 対立達伝子はそれぞれ、QR61遺伝子展表初の超可変領域(位置9~16)に独特の多形配列を育し、これはSDOタイピングによる血清学的QR6時 四性の決定に使用できる。これに対し、QR3, QR41t, およびQR46対立遠伝子は、多形エピトーブ"1975"を共者し、この領域のブローブ単数では識別できないが、各対立遺伝子の他の位置における多形によって謝別可能である。(日本に、QR48とQR42 も、この領域では換別できない。



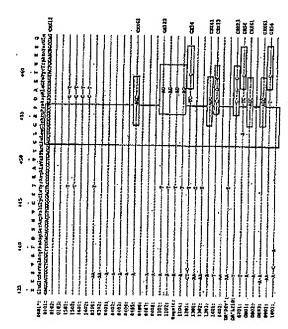


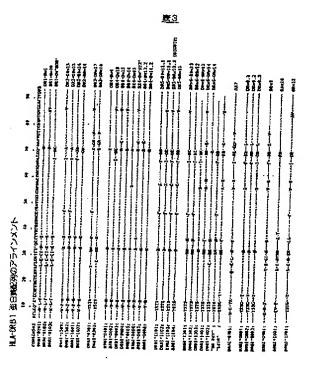
表1C 

9698

表2

......

微多 (コブき)



2. . . . . .

....

古典的な血清学的方法で定義されるIRタイプ ORGおよび OR4を除いて)は、一般的 986プライマーGR48 (SEQ 10 Mote7) およびGR50 (SEQ 10 Mote8) で増縮し、増縮生成物を表4に示す第一のパネルのプロープで分析することにより、維別できる。表4に示す対立遺伝子特異性は、1988対立遺伝子セットに関するものである。本発的の自的においては、「一般的プライマー」は、080 遺伝子第二エクソン配列にハイプリタイズし、 ORG遺伝子座の任意の対立遺伝子の増格に使用することができる PCRプライマーである。増編生成物がプライマーの形ので発生された場合、GR60のハイプリダイゼーション的位のために、位置86 (アミノ酸配列参照) の多形は試験できない。位置88の多形を分析できる生成物を発生に使用できる別のブライマーに DR8151 (SEQ 10 Mote27)、5~CCGAATTCGCCGCTGCACTGTGAAGCT3 がある。

表4:第一のパネルの HLA DRBタイピング SSOプローブ

<b>=</b> -			HT A ORB	
<u> 70 - 7</u>	20 (D) NO.	エピトーフ	<u> </u>	光放(09PE, *C)
CDE X6Q	SEQ ID NO: 19	۳۷/مارس <b>ب</b> ه ۰	0101, 0102, Q1Q3	Q.4%, 43
OHION	SEQ ID NO: 91	' <b>⇔</b> -D-Y"	2446	O.C.X. 42
OHIGE	SEQ ID NO: 90	"₩ <u>-</u> ₽-R°	1501, 1502, 1601, 1601	0.2X, 42
OHSP	58Q to NO: \$7	*V-H*	D4D1-0408	0.2X, 42, 20°
CKX08	\$6Q ID NO: 81	.1-DB.	C103, 0402, 1102,	0.1X, 42
			1501. 1907.	
014122	SEQ ID NO: 93	.Z.	1201, 1102, 1103, 1104	0.2X, 42
CRX21	\$EQ 10 NO: 66	"A-H"	1401, DR 7LY10*	0.1%, 42
CRXXX	SEC ID NO: 11	"P-DR"	1601, [101, 1104,	0.2X, 42
			DK "PEV", 0801, 0802	
CRX49	SEQ 10 NO; 74	10-YK	070), 0702	LOX, 42
CHICE	5EQ ID NO: 19	<b>"T\$TQ"</b>	0401. 0402, 0803, 1201,	Q.IX. 49
			DR "LY10", 1404	
OHIII	2EG 10 NO: 93	"K-D-#"	0901	0.4X, 43
CRX34	\$6Q 1D NO: 10	-24.	1001	0.4X, 42
CRXO	\$8Q ID NO: 60	"R"	0101, 0102, 0403, 0404,	0.1X. 42
			0405, 0406, 0407, 0408,	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
			1403	
OK\$4	SEQ ID NO: 46	.1212.	0301. 0302. 1101-1164,	0.2X, 42
			1301-1303, 1401, 1402	
CRX68			or "Pev"	
	\$ <b>4</b> 0 10 NO: <b>4</b> 4	.a-DE.	(183	0.2X. 42
CRXII	SEQ 10 NO; 63	DRB 'ALL	金州人-018 计立建设分	F 0.2%, 42

表4に示すプローブをハイブリダイズし、ついで42でで15分間洗浄する。0HG9 のみは42でで20分間洗浄する。SSPE洗浄海液はすべて、 0.1%SDS を含有する。 各プローブは 87-来端で MSPに接合させる。

このPCR/SSO OR 6 タイピングシステムは、血液学的に規模されたハロタイプの サプタイピングに有用である。たと犬ば、細胞系\*KOSE\*は血液学的に利定した場合、ORGCボモ社会であるが、PCR/SSO OR 6 タイピングから、\*KOSE\*には2 つの 既なるDRAG対立遺伝子、ORB141302 およびDRB141401 があることがわかっている。 OR3 または DRAG であるサンプルは、DRB1特異的プライマーGH48および CRX37 で増幅し、増削生成物を第二パネルのプローブからのプローブ GR125と CRX50で 分析して、開創できる。

表6:第二のパネルの HLA BR6タイピンク \$\$0プローブ

-		······································	HIA DRE	
70-7	\$EO.ID.MO:	エピトープタ	#立憲任子(OR81#)	表表(SSPE, C)
CH1150	\$50 ID NO: 94	~~	6301	0.2X, 50
CRXXX	SEQ ID NO: 15	*K-OR*	0301, 0302	0,2X, 50
CRXSIA	435Q ED NO: 16	'X'	0401	5.5X, 55
CRX15*	STEQ 10 NO: 64	77-27	0403, 0406, 0497	Q.4X. 55
CRX61	EF :ON CI DWG	77-DK*	1303	0.2X, 42
CRX61	\$8Q ID NO: #2	"I~DR"	(\$23, 120)	0.2%, 43
CRX61	\$2Q ID NO: 30	.5.	0405, 1503, 0601, 0603	0.1X, 42
ORS4 CRX56	18Q 10 NO; 15 18Q 10 NO; 16	.A.*.	0701, 0901, 1201 0101, 0201, 0702, 0401, 0405, 0407, 0401, 1101, 1202, 1301, 0701, 0901, 1001, 1402, DR TEVT, 0401, 0702, 0403, 1502, 1401, 1602	0.2X, 47 0.4X, 47
CRXS7+	SEQ 10 NQ; 18	***	0301, 0402, 0403, 0404, 0406, 1102, 1103, 1104, 1301, DR "CY10," 1401, 1301	0.1%( 42*
CRXII	ESO ID NO: 63	DRR "ALL"	会比4-088 対立運信	₹ 0.2X, 42

表的に示すプロープについては、SSPC洗浄溶液はすべて 0.1%808 を含有する。さらに、a の配骨を付したプロープは、プライマーGM46/CRX37でのDM61特異85時報を要求する。GXX164は42℃ではなく50℃でハイブリダイズさせる。各プロープは 5'-末端で HRPに接合させる。プロープ CRX58および CRX57はそれぞれ、エビトープ'6' およびエビトープ'Y 対立遺伝子とは発金な場論対を作らない。これ

らのブローブは、対立遺伝子より 6殊菌が1 句少ないからである。CRXSS および CRXS7 ガタ< 6殊菌を含むように改良したブローブは本発明の範囲内に包含される。

本発明の目的では、「0881特異的」プライマーは、DR81連伝子の第二エクソンに開接するイントロン配列にハイブリタイズし、他の DR8連伝子にハイブリタイズした(少なくとも1つのプライマーからなるプライマー対である。表6には、UR3 ハロタイプのDR81およびGR83イントロンのヌクレオチド配列の、最後の10のコドンカ53、下ボイントロンの開始前までを示す。CRX37 (GEO 18 NO:73) に下標を付す。実種の矢印はプライマーの延長方向を指示する。豊印はDR81およびDR85 イントロン配列の間での配列の相違を示す。3、下ボイントロンのセグメントは、配列掲載略に、SEO 10 NO:316 (DR83) として掲げる。イントロンの上流足列は対立違伝子配列内にある。

#### 表 6

```
AN deet 0.51 AT 0.70 AN AT THE MAN AT THE CAN THE CAN
```

DR3.DR4 およびDRx6八口タイプは、DR2.DR7.およびDR3 八口タイプと、強化値的に異なることものと思われる。これらの対立適伝子には、プライマーが延長を誘発するにはミスマッチが多すぎるような、イントロン配列に差があると考えられる。DR81対立適伝子は遺伝子職権以前に進化で分化してしまったために、すべてのDR八口タイプからのDR81遺伝子第二エクソンを増幅させるためのDR81特異的プライマー配列を見出すことが困難なのかもしれない。

RA DRB1対立遺伝子は、一般的およびDRB1特異的プライマーで増幅し、必要に 応じて西パネル (表4および5) のプローブで分析することにより、より高い特 質性で開別できる。表4および5の特異的プローブで批別できない1989対立遺伝 子セットの対立遺伝子は、4つの DR2サブタイプ、DRB1+1501, #1602, #1601, およ び#1602 ならびに DR4サブタイプ、DRB1+0403, およびDRB1+0408 である。

OR81特異的 PORプライマーは、OR2, OR7, および OR9ハロタイプを除くすべてか

およびDRMG//ロタイプからのイントロンヌクレオチド配列から設計された(Horn 与:Sequence enalysis of HLA Class (I sense from insulin-dependent diabatic individuals, Hua insunal.1:249.1988 参照)。 本発明は、DRBI特異的プライマー対 GN4S/CR37 に加えて、多数の対立指伝子

ら、CRB1配列を再現性よく増幅することができる。プライマーCRX37 はBR3, DR4.

本系明は、MR7特異的プライマー対 GH4S/CR237 に加えて、多数の対立運転子 および對特異的プライマーを現代する。これらのプライマーを以下に示す。A860 の配列については、Toddら:Nature 329:569,1887参照。

```
ABB SEQ ID NO: 35 SIGGGATECTUGAGCAGGTTAAACA-3:

ABB SEQ ID NO: 35 SIGGGATECTUGAGCAGGTGAAAGAGTTC-3:

ABB SEQ ID NO: 39 SIGGGATECTUGAGTACTCTACGTC-3:

ABB SEQ ID NO: 39 SIGGGATECTUGAGCAGCGTAAAGAGG-3:
```

たとえば、DR4 特異的対域は PCRプライマー対A854/A860 で選成できる(PCRプロフィル: 36サイクル: 94でヘランプ、84でで30秒変性、30秒アニーリング、86でで延長)。 DR3, DR5, およびDR6 野特異的環境は PCRプライマー対A882/A860 で連成できる(38サイクル: 88でヘランプ、96でで30秒変性、30秒アニーリング、85でで延長)。 DR2 特異的環境は PCRプライマー対A883/A860 で運成できる(36サイクル: 95でヘランプ、98でで30秒変性、30秒アニーリング、70でで延長)。

特異的対立達伝子は、本明和書に記載のエピトーブ特異的プローブによる群特 異的増幅後に検出できる。たとえば、DRB1×1001 は、"F-DR"エピトーブ特異的プ ローブを用い、ABB3/ABB0 プライマー対でDR2 特異的増編後に検出できる。

DR2 ハロタイプの対立遺伝子の検出は困難であるが、それは本発物の群特員的プライマーとダイピンク方法により克服される。DR2 ハロタイプからの DR6対立遺伝子の一般的プライマー増構では、ORB1およびIRGSの荷遺伝子虫が増稿される。血剤 CRM15および ORw16サプタイプの決定には、"F"(位置47) エピトープ特異的DNA プロープを使用できたが、"F"(60001. 一部のDRM13 対立遺伝子、ならびにすべての ORw11および DRV12対立遺伝子にも存在に、他の方法によればさらに完全な機別が可能になる。すなわち、エピトープ "I--A" 8コードする配列にハイブリダイズするように設計された評特表のプライマーがIRB1を1801 および DRS14 1502対立遺伝子を増稿し、増増生成物が "MPR"エピトープ特異的DNA プロープとハイブリダイズする。プライマー 028150 (560 10 M2 228) (5-TGTCCACCOCCG CCCGCCCCCT-3)は、このような対立遺伝子を拷問的関係 (GH46と)の実施のために

設計されたプライマーである。089540201 および086540202 対立遠伝子も数(エ ビトープ)特異的"iーA" プライマーで同様に準備されるが、これらの対立遺伝 子はDR91\*1601 および9891\*1602 対立遺伝子としか存在しないので、プロープハ イブリタイゼーションの結果はエビトープ"001"隔性および"部8"降性である。

さらに、本明前歌に例示した印81特異的プライマーは「PR2村立遺伝子を増幅しないので、上述の「PR2特異的増幅は、同じ反応奪中で、FR81特異的増幅と同時に 実践できることに注目すべきである。他の対立遺伝子および群特異的プライマー および情報方法は事務例に記述する。

RLA DRB 遺伝子際における著しい対立遺伝子の多様性は、他のクラスエ8遺伝子の場合と内限に、主として第二エクソンに身在する。一般的に、第二エクソンを列多形のパターンは、特定の DRB遺伝子原において集団に存在する場合には、多様な異なる対立遺伝子に認められる特異的多形セグメントをもつ寄せ集めである。原理的には、このような異なる対立遺伝子間で共通のエピトープには、共通の担抗、遺伝子疾損、または収束進化の反映を考えることができた。しかしながら、オリゴヌクレオチドへの別判定の目的では、この多形の器せ無めのパターンは、中のオリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションによっては多くの対立遺伝子は同定することができず、パネルのプロープによる独特なハイブリダイゼーションパターンによって同定できることを意味する。

"SSO"と呼ばれる本発明の配列特員的オリゴヌクレオチドブローブは、適当なハイブリダイゼーションおよび洗浄条件でに本発明の方法に使用されると、種のて特異的で、単一のヌクレオチド多形を開削できる。RCP法で用いられるプローブとは異なり、本発明の SSOは、対立遺伝子が異なるかどうかのみでなく、対立遺伝子がどこでどう異なるかを決定するためにも使用できる。

好求しい突然機械においては、プローブは、表1 および2 2 四角に悪んだ名対 立遠伝子の DHA領域と関レ配列またはそれに相痛性の配列からなる。たとえば、 プロープCRX60 はアミノ酸 "¥-8-L"をコードするDHA に特異的で、DR1 対立遺伝 子に独特にハイブリダイズする。プロープCRX48 はアミノ酸をコードする"G-YN" に特異的で、DR7 対立遺伝子に独特にハイブリダイズする。他の例は表を考慮す れば明白であろう。

DR3, DRwiii. およびDRw6を他のDR血清型から抑制するためには、単一のプローブ

(すなわち6H59) を使用すればよいが、DR3,0%+1、およびDR#6の間での無別には 付が的なプローブが必要である。DR#110をGR3 およびDR#8から識別するためには、 OR#17 上の"8515"および"E" エピトーブ (コドン10~13および58) をコードする DM にハイブリダイスするのH56+CH122 プローブの組み合わせが使用できる。同 様に、OR#6 (DR31+1331およびDR31+1302 ただレエピトープ"1--DK を有するが、 なおのR#6であるのR81+1303 は含まない) をDR#11 および OR3から識別するために は、"YST3"および"1-DE" (コドン67~71) エピトーブに相当するプローブの組み 合わせGR64+1CHXO6が使用できる。

大部分の血清38型を決定するために使用される、後4記載の SSOプローブの組み合わせを、表7に示す。

型/ 血液R型の決定に使用される SSOプローフの始み合わせ

_		
	<u> 第2イプ</u> 等	プロープ性的
	DRI Dw1	CRX60 + CRX04
	DRI Dw "BON"	CRX60 + CRX06
	DR2	OHIO\$
	DR4 Dw4	QH59 + CRXS3
	DR4 Dw10	GH59 + CRX06
	DR4 DW13, 14, 15	GH19 + CRX04
	DR3, W11, W5	GH16
	DRw11.1	GH36 + GH122 + CRX35
	DR#11.2	GH56+GH122+CRX05
	DRw12, DRw2.3	GH101 + CRX63
	DRw13 (1301, 1302)	CH 56 + CRX06
	DRw14 Dw16	GH36 + CRX04
	DR=14 Dw9	OH56 + CRX23
	DR7	CRX49
	DRw8.1, w 8.2	GH102 + CRX15
	DR9	OHILL
	DRWIO	CRX34
	DR+12, all DR+8	CH102

□ DR血清型(養4)をさらに細分類するためには、以下の養8に示すように、養 ちに示すプローブの使用が要求される。

#### 差8 34のHLA 0R81対立遺伝子 (1988セット) 中31を識別する 880プローブの値み合わせ

228215	<u> 70 - 7</u>	DERIC	ブローブ
0101	CRX60 + CRXXX + CRX56	1103	GH122 + GH56 + CRX57 + CRX68
0102	CRX60 + CRX04	:104	OH122 + OH36 + CRX35 + CRX57
0103	CRX60 + CRX06 + CRX56	1201	GH102 + GH34 + CRX63
DRZ	OHior	1301	OHS6 • CRUIDS • CRUIST
0301	DK56+GH125+CRX50+CRX51	t301	GH54 + CRX05 + CRX35
0302	OFES6 + CRIXSO + CRIXES	(30)	GHSa + CHXa2 + CHX61 + CHX16
6401	GHIS + CRXII + CRXII	(40)	GHS6 + CRX23 + CRX57
0402	G1839 + CRX68 + CRX57	1402	OHS6 + CRION++ CRIXS6
0403, 0406	GHI9 + CRXLS + CRXST + CRXO4	DR*PEV*	CHS6 + CRX35 + CRX16
0404	0H39 + CRX04 + CRX51	0701	CRX49 + OHS4 + CRX38
0401	OHIP + CRXO+ + CRX61 + CRXG6	0801	GH101 + CRX61 + CRX35 + CRX56
6407	OHIS + CRX15 + CRX16 + CRX04	0802	GHIM + CRXXI + CRXX4
0408	OHSP + CRXOF + CRXS6	0803	GH103 + CRX61 + CRX63 + CRX66
1101	OH122 + OH56 + CRX35 + CRX56	0901	GH111 + GH54 + CRX56
1101	OH121 + OK54 + CRX05 + CRX51	1001	CIO234 +CIO236
		DR'LY10*	GHIM + CIUCIS + CRKS7

"HRP-SSO"と呼ばれる本発明の西洋ワサビベルオキシダーゼ接合SSO には、使用が簡単で検出可能なシクナルを集造に(通常1~10分)失成する発色性または化学発光性差質を使用する検出方法が軽適される。HRP-SSO は4℃で保存すれば、活性の明らかな低下を伴うことなく2年以上にわたって支起である。FCR protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, Gelfand, Sninský 3 White 編, Academic Press, Inc., San Olego, 1988刊)中の Levenson & Chang による Monisotopically labeled probes and primera"と類する論文を参照。女材標準プローブも使用できるが、本発明によって多えられる重要な別談は優れた感度であって、その必要はない。

検出のためのドットブロットフォーマットは、多数のサンブルの迅速なタイピングを可能にも、NLA CR3 の対立遺伝子頻度の決定に有用である。PCR/SSO CR B タイピング用に最近発発された変法に固定化逆相ドットブロットフォーマットが

ある。Seki 5:Genetic analysis of applified DHA with impolitized sequence "specific oligonumisatide proban. Proc. Nati. Acad. Sci. USA 86:6230, 1989 および1689年5月4日出版の係員中の出版審告第 347, 486号参照。これは参考として本明報書に導入する。この集作においては、 SSOプロープはフィルターに適用され間定されるので(フィルターに適用され固定される境極DNA よりも)、「逆 特ドットプロット」の題が使用される。

. . . . . .

, 逆根ドットプロット操作によれば、単一のサンプルを、一直の翻定化プロープ を含する製と1回ハイブリダイズさせることで分析が可能となる。サンプル数 が使用プロープを越える場合(たとえば、患者対コントロールまたは集団連伝学 研究)では慣用のドットプロットフォーマットが有用である。逆根ドットプロット トフォーマットは、健床的、診断的、および法科学的分析に場合に重複がある。 逆相ドットプロットフォーマットは例名に詳細に記載する。

以下の実施例は本発明の好ましい実施機構を例示するものである。この例は、 本発明が、好きしい実施機構においては、多様な起源からの様々なサンプルにつ いての単純、迅速かつ正確な DRB タイピングを可能にするHLA DRB タイピングの ための料向位元素PCR/SSD システムを提供するものであることを示している。

#### <u>例1</u> 増爆および検出方法

プローブの第一のパネル(養4)でのサンプルのタイピングには、 0.518 の ヒトゲノムBMA き、Sekiら:Primer-directed enzymatic amplification of DNA polymerass. Science 239:487,1988; Scharfら:Hou. Haumoi, 22:81,1988;および Scharfら:Proc. Hati. Acad. Sci. USA 88:6216,1989に記載された反応成分を用いて 増積した。これらの文献は参考として本明知書に導入する。

HLA DRB 一般的 PCRプライマーはGH48およびGH50である。これらのプライマーの配列を以下に示す。

GH46 SEQ ID NO: 67 S-CCCGGATCCTTCCTTGTCCCCACAGCACG
GH59 SEQ ID NO: 68 S-CTCCCCAACCCCGTAGTTGTGTGTGTCA

プライマーは従府議合物中に500nM存在させた。これらのプライマーは、272 協議対(bp) フラグメントモ生成し、PCR 産物をクローニングするための日asH I およびPst I 制限郵位の配列を含有する。増幅OM をBoaH I およびPst I で導

化すると内部PstI部位により 248bp産物が生成する。

すべてのハロタイプ (DR2, DR7, およびの6) 参除く) からの0881対立遺伝子は、 PCR プライマーGH46およびCRX37 によって特異的に増幅された。 CRX37プライマ ーの配列を以下に示す。

CRX37 SEQ ID NO: 73 5'-GAATTCCCGGGGCGCGCCCT

6H46/CRX37プライマー対での増模は 287bpフラクメントを放生する。プライマーGRX37 は 6 年末総に日COR I 制成エンドヌクレアーゼ経典配列を挿入してクローニングを容易にし、プライマー対6H46/GHD と異なり、このプライマーでの増組および日2MHI/EcoR I 消化は完全長 PCR激物の単葉および分析を可能にする。

このような単離および分析は多くの場合、 PCR強物の又クレオチド配列の決定を包含する。 RLA 6R6 対立適伝子の配列決定には、 1 u.s の特別ヒトゲノムORA をプライマー対5H44/GR50 およびGH46/GR37を用いて増減した。 増殖されたORA を、Scharfラ: Hum. Immunol. 22:61, 1988 およびScharfラ: Hum. Immunol. 233:1078, 1986 (これらの起転は参考として本明短輩に導入する) に起館の方法によって、M13no10にクローン化した。 挿入体を次に、Sangerラ: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:6463, 1977に記載のジデオキシチェーンターミネーション境代(1688年9月23 日出版の米国特許出版数 246, 387号も参照。この記載は参考として本明報書に導入する)によって配列決定した。

上記表1 および2に示した配列は、ゲノムクローニングにより(Nornら:Hum. Immunol, 21:249, 1988, 砂原。この記載は参考に本明総響に導入する)、PCR 増幅により[Gritchら:Immunoblology of HLA(du Pont模、Springer-Veries、New York)1989 年刊、およびScharfら:Proc. Nati. Acad, Sci. 1884 86:8215, 1982 静原。この記載は参考に本明総書に導入する)、または文献「Ninda-名委員会: immunosenatics 31:131, 1990; および Gresersonら: First dozeia diversity of DR and DO subregion aliales. in Jesunobiology of HLA(du Pont 編、Springer-Verlag, New York)1983年刊参照)から得られたものである。

サンブルは、Tag ボリメラーゼ(PGCI, Norwalk, CT) 1,25単位は、5単位でなく) を反応容量 100 u l あたり加えたほかは上述の反応条件を用い、32サイクル(と <に指示のない取り)で増幅した、膀胱密度者についてのCDNAを、HLA-DRI 遺伝 子思で、敬修されているように (Kawasski: "Amplification of RHA" in PCR protogols: A Guide to Methods and Amplifications (Innieら極 Academic Press, San Dieso) 1983 刊参照)増幅した。すべてのサンブルを高級鉱油 (Sissa. St. Lauls, 40)100 μ | で使い、蒸発を防止した。増幅後、鉱油被覆減を 100 μ | のク ロロボルムで抽出した。

各サイクルの熱プロフィルは以下の速度での接示時間のインキュペーションとした。すなわち、84℃で46秒(別議開製の延生)、56℃で46秒(プライマーのアニーリング)、および72℃で46秒(別議開製の延長)である。最終サイクルののちに、PECIサーマルサイクラー (Perkin Elser Catus Instrusents, Norvalk, CD) は、最終の延長が完全に行われることを確実にするため、サンプルを72℃で10分間インキュペートするようにプログラムした。サンプルの交換大能を辿けるための注意が必要である。とくに、一つのPCR の確物を非準備サンプルと大調を仕ることは防止しなければならない。1990年7月24日出鉄の米週物料出鉄第 567,517号およびその出版の1890年11月 2日付 CIP出鉄(いずれも、参考として本明和書に導入する)には、非準備サンプルに「キャリオーバー」した PCR高物の増幅を防止する好法しい方法が乾燥されている。

地域後、増幅のM、の小部分を変性し、一道のナイロンフィルターへのクロスリンキングに適用した。多フィルターをついて駅構プローブの一つにハイブリダイズした。多 SSDプローブは四学ワサビベルオキシダーゼ(MP) に共有動きで揺合させ、発色性されば化学発光性高質の存在下における楽園の元素検出呼及を提供する。又クレオド配列、コードされたアミノ酸(またはエピトーブの可能性)、および周定されるRR型、ならびに多プローブの発浄条件を養4および5に掲げる。すなわち、各様報(MMサンプル5 u)を、0.4M N8H および 25mM EDTA か

らな多潔含物 100 μ I と混合し、得られた混合物を、ドットプロットマニフォルド(BloRad Richmond, CA)を用いて、BloDyne Bナイロンフィルター(Pail Corp., Gian Cove, NY)に適用した。まだドットプロットマニフォルド中にあるフィルターを、10mk Tis-HCi および0.1mM EDTA からなる混合物。pH 6.0で読多し、Whatman 33M 遺紙で表現させた。Strata(inker <sup>III</sup> Gtratasene, La Jolia, CA)が光報ボックスを用い、出力 65mJ/cm<sup>2</sup> での紫外線照射により、RM をナイロンフィルター上に始またした。

#### 特表平6~505625 (11)

他の記載がない限り、フィルターはすべて、2×SSFE(食塩リン酸ナトリウムEDTA)、5×デンハルト海激および 0.5%SDS 中、ハイブリタイセーション海液1 al あたり 2 pnois の HRP-SSDプローフを用いて、42℃で15分配ハイブリダイズレル。 海洋ワサビベルオキシダーセ接合オリゴスクレオチドは、Levenson & Chang: In COS Protocol: A Guldo to Mathods and Application (finita 54編、Academic Press, Inc., San Diego) およびSekiら: H. Eng. J. Med. 319:537, 1988 の記載に従って報道された。多プロープのフィルターは 26 nlのSSPE2推復中、表4およびらに示した国復で15分間(他の記載がない規り)洗浄した。

洗浄機、発色性の類科裁算で展開すべきフィルターは、PBS中室温で30分間洗浄し、ついで 0.1mgの3.3°.6.5°-テトラメデルベンチジン(TMB)(Fluka)を1mlがだり、および0.0015%の過酸化水素を含有する100mMクエン酸ナトリウム中に取り、線やかに復拌しながら室温で5~15分間インキュベートした。展開したフィルターを PBS中ですでき、匿ちに規制した。化学発光検出系 低CL:Amarshau, Arfinston Height, IDで展開したフィルターは PBS中で6分間するぎ、減やかに損料しながら 60.1名次中に1分間置いた。ついで、フィルターは重温で1~6分間×路に費出した。

#### 例2 CRB1特異的場構

各種DR81対立遺伝子を開閉するDR81遺伝子座の対立遺伝子の数種の多形配列は、他の ORB遺伝子原の対立遺伝子上にも存在する(表3 参照)。DR3 DR81対立遺伝子上のエピトープ "K-GR"(コドンバー74) をコードするヌクレオデド配列がその例であり、この領域に対するプロープ(CRXSO) は DRY11およびRMS対立遺伝子からDR3 を費別できる。しかしながら、このエピトープは、DR03対立遺伝子のRMS2を(CR8340101)によってもコードされ、一部のDR#67/ロタイプおよび一部の ORS/ハロタイプ上にも信様に存在する。PCR プライマーGR46/GR50 はすべての GR8遺伝子座と単幅するので、飲名遺伝子座においてDR#67/2であったDRM6サンブルを、このプロープを用いて DR3サンプルから機別することは不可能である。

本発明は、CRBI遺伝子座のみを特異的に増減する PCRプライマーを提供することによって、この商度を解決する。これらのプライマーの一つは、第二のエクソンからすく下流のイントロン内領域にハイブリダイズする。イントロンは、DRBI

と0R83連伝子庭を開別する配列を含有する。プライマー(CRX37) はDR81イントロン配列に特異的にハイブリダイスレ、このプライマーを0H46と組み合わせると大部分のハロダイブについて、0R81特異的増展を可能にする。

IRB1速伝子巫がこれらのOR81特異的プライマー保護で増福される唯一の遺伝子 無であるかどうかを確認するために、DR2 DR3. およびDR4 kTC(ホモ接合タイピン グ細切 DRAを、これらのプライマーおよびすべての DR8速伝子娘のための SSOプ ロープで増進し、分析しだ。GR31速伝子庭に加えて、CR2 ハロタイプはDR82およ びR85速伝子庭を有し、DR3 ハロタイプはDR83速伝子庭を有し、OR4 ハロタイプ はDR84速伝子展を有する。結果は図1 に示す。

これらの結果を得るには、約 200 ng のHTC DHA を一般的 DR8プライマーであるGH46/GH50 またはDR81特異的プライマー6H46/CRX37によって均幅し、例1 の記載のようにつイルターに適用した。増幅的認気OH4(サンブル1~4) を含有する各フィルターは図1に示すプローブとハイブリダイズさせた。そプローブがハイブリダイズする遺伝子座をカッコ内に示す。GXX39 はDR4 DR7、DR452D CRX7リタイズする遺伝子座をカッコ内に示す。GXX39 はDR4 DR7、DR452D CRX7リダイズする。CRX22 はDR8X対立遺伝子DR452D CRX7リダイズする。CRX22 はDR8X対立遺伝子DR452D CRX7リダイズする。

980 の肥利:

は、Scharfら:Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6216, 1989によって記載されている。 この記載は参考に本明報替に導入する。

プローブGR91 (SEQ 1D HO:88, s-CTCCCGTTTATGGATGTAT) はOR8が運転子座に特異数にハイブリタイズする。このプローブは約1 に記載したようにハイブリタイズする。このプローブは約1 に記載したようにハイブリタイズする。このプローブは約1 に記載したようにハイブリタイズさせ、T × SSPE, 0. 1% SSP 中、42℃で16分間洗浄した。増幅されたサンブルは、(1) No OHA (陽性対照); (2) OR2 HTC\*SCHU\*; (3) OR3 HTC\*OBL\*; および (4) DR4 HTC\*BSL\*ごある。ハイブリダイゼーションおよび洗浄工程様、プローブは増強に単ルミネッセシスで放出された。

図1は、3つのH7C すべてについてのすべての 983演伝子楽は一般的 DR8ブライマーで推幅するが、DR81特異的ブライマーは DR3および DR4 HTCからのDR91流 伝子盤を推幅するのみであることを示している。興味あることに、DR2 HTC につ

いては、RR82進伝子底は、弱いとはいえ、DR81特別のブライマーで増幅される。
RR81特別のブライマーは、図1 および2[に示すように、RR2 DR7 および200 を除き、試験されたすべてのRアハロタイプからのDR81配別を効率的に増幅する。図2
に示す軽果を得るには、HTC からのグノムDRA 約 0.5 us を、DR81特別のブライマーGR48/CRX37で、HTA DR8 について増幅した。増極反応およびフィルターは、例1 に記載したのと同意にした。各フィルター片は示したプローブの一つと、適当なハイブリダイゼーション条件下にハイブリダイズし、系統操作下に洗浄した(変4、5 および7参照)。ハイブリタイゼーションおよび洗浄工作の表別のでは発色性医質TA8 で展開した。サンブルは、(1) DR1 NTC\*KASPO3\*(2) DR3 HTC \*SCRU\*(1) DR3 HTC \*VASPO3\*(1)

"SPACH": (9) DR9 HTC "DKB": おんび (10) DR w 10 HTC "SHY

である。 図2の相乗は、087 プローブ CRX49でG-YKC)が、この変数では輝く増幅された 087 HTC にはハイブリタイズしないことを示している。これらの結果から、完全 な0881タイピングには一般的およびORB(特質89プライマーを使用できることが明 らかである。

HTC "SPOOLO": (6) DRW6 HTC "OMW"; (7) DR7 HTC "MOU"; (8) DRW8 HTC

#### <u>943</u>

#### 血清内を型1~10のタイピング

(f) DRI HTC "KAS9003"; (z) DR2 HTC "SCHU"; (3) DR3 HTC "QBL"; (4) DR4 HTC "BSM"; (5) DR5 (DR4)1) HTC "SPOC)O"; (6) DR46HTC "DM4"; (f) DR7 HTC "MOU"; (8) DR46 HTC "SPACH"; (9) DR9 HTC "DKB"; 23 LU" (10) DR410 HTC "SHY".

#### である。

図3は、古典的、血海学的に定義された原型 (~10についての、HTC のパネル

上でのDRタイピングの結果を示す。各古典的限型の検出に単一のプローブを使用することができるが、2つの異なる PCRプライマーが必要であった。DR3 および ORMを除くすべてのサンブルで、一般的 PCRプライマーGH49/GH50 が使用できる。この系列のDR3 およびORMサンブルのDNA の指標には、DR81特異のプライマー対 GH48/CRX37を使用した。DR3 HTC\*OSL\*\*(DR\*17) 上の\*Y\*\* エピトーブ (GH125;コドン26) を検出するために使用されたプローブは、DRx6サンブルの DR3対立達伝子 (DRx652)上にも存在するからである。標準 DR8プライマーを使用されていたならば、\*Y\*\* プローブは欧x6サンブルにも原準にハイブリダイスしたと考えられる。

#### 

特定のサンプルのタイピングに残しては、一般的プライマーを最初の増格に使用し、ついせ増格のM を最初のパネルのプローブによってプローピングレなければならない(表4および7)。このパネルのプローブは大部分の血清型を傳定するが、GHSS(YSTS\*)はDRx8から BR3を明らかに開例しない。

9H6Sで輸性を示したサンプル、または特定のOR型の組分額(たとえば、DR4 の 0m型をたはORMBのサプタイプ)するサンプルには、第二のパネルの一部のプロープ(表 5)を使用しなければならない。上述のように、第二のパネルの一部のプローブは PCRプライマーのORBI特員的対による増幅を要求する。第一者よび第二のパネルからのプロービングを組みをわせることにより、1883対立遺伝子セットにおける34のDRBI対立遺伝子中、31の識別ができる。これらの対立遺伝子の同定に用いられる SSOプロープの組み合わせを要8に示す。これらのプライマーおよびプロープによっては OR2サプタイプ(ORB1\*1501, \*1502, \*1501, および \*1602) は類別されず、これらのプローブによっては ORB1\*4/403とORB1\*4/408 対立遺伝子は世別されない。

本発明の一つの DR2プロープは、DR85遺伝子座の第一の超可変領域でG-D-Y') にハイブリダイスする配列からなる。DR85遺伝子座はすべての紙知 DR2ハロタイ プ上に存在し、それらのハロタイプ上にしか存在しないので、このようなプロー プは、一般的 DR3プライマーで増催した DR2の型の判定に信頼をもって原用でき る。プロープGH104でV-P-R')はDR2 DR81遺伝子族の第一の超可変領域にハイブリ ダイズし、一般的プライマーで増増すると DR2 DHAに特異的にハイブリダイズす 3 (別1) が、988特殊的プライマーではハイブリダイスしない。これらの2つのプローブは一般的プライマーでの場際においては、1982の周一のインジケーターである。

#### **M**5

#### OR4 のサフタイピング

084 特殊性のサブタイピングは加海学的には終施できない。サブタイプは二次 元磁白質ケル電気泳動および胸絶性タイピングによって明らかにされたが、何方 法とも類隣で特殊がかみ。 Dw4, Dw19, Dw19, およびDw14は高いに、遠伝子の第三 の超可変徴域の位置70~74で異なっている。 Dw18はまた、位置57にセリンで6°) を有する。 Dw13はまた、位置71にCw14かよびDw16と同じアルギニン残遇を有する が、位置74のグルタミン戦で6°)で異なっている。

・ 核果として、SSO プローブ、CRX04(R\*)は0w13,0v14.および0w16対立遺伝子にハイブリダイズする。これらの対立遺伝子を互いに無限するには、さらにプローブが終史である。SSO プローブ、CRX16(R-E)は0w19を0m14および0w15から核異のに無限し、CRX81(f\$\*)は0w14から0m15を特異のに無限する。様々な0x81対立遺伝、作とえば0w14.1または0w14.2からの0x81和404 または0x81和4040)を嫌別する血量880(\*6\*対" 多形はCRXS6 プローブ(\*6\*) およびCRX57 プローブ(\*\*)を用いて検出される(複5 参照)。

ORタイプ1~10のHCT および5つのDR4 Ovサブタイプは、OR91特異的プライマーSH46/CRX37で増幅し、6つの同一のナイロンフィルターに適用し、Ow数に特異の対応HR-SSO とハイブリダイズさせた。結果は図4に示す。

図4に示した結果を得るには、約 500 mg のHTC ゲノムDMA を上述のDRB1特異 的プライマーGH46/CRX37によって増幅した。 AおよびBの対のフィルターそれぞ れを図4に示すプローブとハイブリダイズさせた。 サンブルは、列Aでは、

(1) No DNA countil (2) DRI HTC "KAS9003"; (3) DRI LITC "SCHU"; (4) DR3 HTC "GHL"; (3) DR4 Dw4 HTC "SSM"; (6) DR4 Dw10 HTC "YAR"; (7) DR4 Dw13 HTC "RA"; (8) DR4 Dw4 HTC "SM92"; (9) DR4 Dw15 HTC "LXT3"; (10) DR3 HTC "FOOLO", および(11) DRw6 HTC "OMW"; 例日1 (1) No DNA countil (2) DR7 HTC "MOU"; (3) DRw8 HTC "SPACH"; (4) DR9 HTC "DK1"; および (1) DRw10 HTC "SHY" である。

ハイブリダイゼーションおよび洗浄工程後、プローブは増強化学ルミネッセン

2つのパネルのプローブで同じハイブリダイゼーションのパターンを与える。位 #37が088140403 ではチロシン残蓄であるのに対し、CRB144408 ではセリン残蓄 である点を除いて、DR8140408 はDR8140403 と同一である。上に示したプローブ の例示的パネルではこの多形は検出できないが、さらに付加的なプローブを使用 すれば、完全な難別が可能となる。

#### 916

#### 0R3, 0R5, DRv6, およびDRv8のサブタイピンク

ORG, DRG, DRv8. および DRv8 の「スプリット」についてのサブタイプは、各ハロタイプの各種対立選択予問を識別するプローブの使用により、同定できる。た にえば、DRv17 およびDRv18 の両者は「K-RG\*プローブ CRXSDにハイブリダイスす るが、DRv17 およびDRv18 の両者は「K-RG\*プローブ CRXSDにハイブリダイスす るが、DRv17 かみが「Y\*プローブGR125 にハイブリダイスし、これでDRv17 は、 DRv18 から推別できる。同様に、DRv11 およびORv12 対立遺伝子 (通常 DR6とし で分類される) は互いに、また3つのDRv8対立遺伝子から、プローブの別の組み 合わせを用いて識別できる。

「一般的」 加海型 1 ~10のHTC と、同時にDR3、DR6、DR46、および DR48 サブタイプのHTC から、DR81特異的 PCRプライマーCRX37/GH46で増幅した DR4を12のフィルターに適用した。これらのサンプルの血清研制は展知であったから、本発明のこの機様を例示するために、これらの対立遺伝子のサブタイプの決定に必要なプロープのみを使用した。結果は割5に示す。

図5に示す結果を持るためには、約 600 ng のHTC ゲノム0NA を0R81特異のプライマーGN45/CRX37によって増越した。Aおよび自の対のフィルターそれぞれを図4に示すプローフとハイブリダイズさせた。サンブルは、例Aでは、(1) No

DNA controls (2) DRI HTC "KAS9003"、(3) DRI HTC "SCRU"; (4) DRWIT HTC "QBL"; (5) DRWIE HTC "RSH"; (6) DRWIE HTC "RSH"; (6) DRWIE HTC "RSH"; (6) DRWIE HTC "RSH"; (7) DRWIE HTC "RSH"; (7) DRWIE HTC "RSH"; (7) DRWIE HTC "ARMALA"; (11) DRWIE HTC "SLE"; 列島; (1) No DNA controls (2) DRWIE HTC "HAG; (3) DR PEY "BAR F"; (4) DRY HTC "MGU"; (5) DRWIE HTC "TAB"; (6) DRWIE HTC "ARC"; (7) DRWIE HTC "SPL"; (8) DR9 HTC "DKE"; 活态区 (9) DRWIO HTC "SHY" である。

GRSC(YSTS\*)がGR3, GR5, およびGRMGにハイブリダイズレ、GH102(YSTG\*) が GRYGにハイブリダイスすることを示す第一パネルのプローブのデータは図7に示 スで検出された。パネルへは、902,087,およびORw9 NTCを験くすべてがCRX12 に ハイブリダイズなることを示している。

バネル自体、CRX63 がTw4 HTC BSM に特異的にハイブリタイズすることを示している。DR4 Dx4 のタイピングのための他のプロープには、DRD183 (SEO ID NO 230)があり、例目に記載のハイブリダイゼーションおよび洗浄条件が使用される。ズする。低い落場条件(2×SSPE 0 1 % SDS, 42で16分洗浄)ではるかに強いシグナルを与える DR4 Dx4のタイピングのためのさらに他のプローブは、以下に示すプロープCRX64 である。

CRX64 SEQ (D NO: 83 5'-HRP-GAGGAIAAGE/GOCC-3'

HP は西洋ワサビベルオキシダーゼである。 Lはイノシンで、これはブローブを 不安定化する。

パネルのはOxto NTC"YAR"の SSO CRXOSでI-OE")による検比を示す。このプロープはHTC"OM"にもハイブリダイズし、これはORx13 でありこの多形を共有する。 パネルロは CRX15の特異的ハイブリダイゼーションを示し、これはOf13サンプルJHA を、Ox14サンプル8M92およびOx15サンプルJK13からMMJする。

パネル巨は、CRXO4 の、それぞれのV13.0v14,および0v16である。JHL BM92 およびLKT3へのハイブリダイゼーションを示す。CRXO4 はDRB1+0101 である DR1 HTC KAS9003 にもハイブリダイズし、これらの3つの内型とこの多形でド)を共省する。DR4 Dv14型は、サンブルがCRX15(\*R-E\*)またはCRX61(\*s\*;パネル行のしずれにもハイブリダイズせず、CRXO4(\*R\*)とハイブリダイズするプローブハイブリダイゼーションパターンから、推測される。パネルFは CRX61のOv16HTC\*LXT3\* へのハイブリダイゼーションを示す。

図4は、一般的に、本発明が、第一のパネルのプローブへのハイブリダイゼーションのパターンにより、これらのプローブで複類される多形領域を共有するサンプルを障別できることを示している。たとえば、"R" エピトープ陽性のOR4 Cx型はGH59("V-H") 陽性およびCRX50("Y-L-F")落性により OR1から難別され、DR4 Ox10は、GH環境性およびGH54("YSTS")降性により ORx13から難別される。

表名は、このシステムが開発できない2つの DR4サブタイプがDRB140403 およ びDRB140408 対立遺伝子であることを舒している。これらの2つの対立遺伝子は

す (例7が照)。

ハイブリダイゼーションおよび洗浄工程後、結合したブローブは増強化学ルミネッセンスで検出された。冬サンブルにハイブリダイスするブローフのパダーンを決定することにより(養8参照)、図6に示すように、サンブルは特異的な対立遺伝子に紹分素できる。図6には、ブローブにハイブリダイズしたサンブルに中の記号を付してある。図書は特定のブローブにハイブリダイズしなかったサンブルポルでしている。 KOSE および BARP を除いて、すべてのサンブルがホモ接合型 総数であった。

DR3, DR5, DR46, および DR48 サンブルのハイブリダイゼーションデータおよび (殊型は図6に示す。サンブル KOSF は血清学的に39x6ハロタイプの木モ接合体と分類された (このサンブルはDx4 およびDx18と表示されていたが)。レカレなが 5、それはDR3(\*1302 (CRXO6+CRX59)およびERB(\*140) (CRX23+CRX57)と分類された。

サンブル"BARP"は応涛学および WLCで OR4 De10 およびORN6と分類される。したがって、"BARP"はブローブ CRX35およびCRX58でF-DR"および"0")にハイブリダイズし、これにより新たに発見された"OR PEV" CRx6対立連伝子として分類され、またプローブ CRX06およびCRX57(\*1-DE"および"V")的ににハイブリダイズして、OR4 Or10対立遺伝子(の例は4402) の存在を反映している。

#### 

確立された締約系の多くはクラスエ分子を発現しないので、それらのBR関を加 海学的に利定することは不可能である。プラインドパネルとしてコードされた6 つのクラス工隆性補約系を一般的プライマーxiGH46/GH60 で埋縮し、第一のパネ ルのプローブ(表4)で探索し、サンブルの一般的血清BR型を確立した(図7)。

これらのおよび他の相談系の原理判定のためには、100 ngの構製系がA を一般 69 HLA DRDプライマーGH46/分的 により、30サイクルを行って連幅した。準備された樹談系DMA(サンプルA〜F) を含有する各フィルターを、一般的 HLA DRDプライマーで増幅した HTC DMAを含有する対象フィルター (サンプル1〜II) と関時にハイブリダイズさせた。フィルターはすべて係1 に記載のようにして調製した。結集は翌7に示す。各フィルター対は、示した 880プローブにハイブリダイ

转表平6-505625 (18)

ズきせた。サンブルは、 (i) No DNA control; (ž) DR1 HTC "KA59031\*(j) DR2 HTC "SCHU"; (4) DR3 HTC "QBL"; (5) DR4 HTC "BSM"; (6) DR3 GRWH) HTC "SPOCIO"; (f) DRWB HTC "OMW"; (i) DRW HTC "SPOCIO"; (i) DRWB HTC "SPOCIO"; (ii) DRW BHC "SFN"; (A) No DRW CONTROL (B) RJH; (C) 616; (D) Beguin; (E) RJM; および 伊 R5225 である。

CRX12 プローブのシグナル強度は、すべてのサンプルが等しく良好に増幅されたことが明らかである。Rali,RMG,および RS228は、OR#10 (に特異的なプロープ CRX34 にハイブリダイスする。サンプル616 は、このサンブルが ORI対立遺伝子を省ずることとを嫌しない、プロープCRX60でMLF\*)およびCRX04でR\*\*)にハイブリダイスする。

網路系 8egul(は、987 プロープCRX49(「G-YK") および2つの他のプロープ、 6H58("YSTS")およびGH122(「E")にハイプリダイズし、それは DR7およびDR#11 で あることが示唆される。しかしながら、このサンプルからの推測されるDR#11 対 立運会子はCRX35("F-DR";DRS1#1101) またはCRX06("(-DE";DRB1#1102) のいずれ がにハイブリダイズすることが期待されたがせず、以下にさらに述べるように、 DR#11 の新規な変異体であることがが破される。

選賞なリンパ球球検挙を育する患者に由来するこのサンプルは、この位権における多形の性質を決定するために、クローン化し、配列を決定した。対立遺伝子の配列決定により、エピトーブ "F-OK" をコードする第三の超可変領域に実際、配列多形のあることが示された。この対立遺伝子はDRB1対103 として分類された(使3の配列"Segult"参照)。プロープCRX68 が第三の超可変領域のこの多形に待異的にハイブリダイズする(要4参照)。

他のサンプルすべてもGH56"YSTS"プロープにハイブリダイスし、したがって、これらは、DR3. QRv11. またはDRv6でありうる。これらの他のサンプルは"5"プロープにハイブリダイズしないので、DR3 またはDRv6の可能性がある。しかしながら、このサンプルは、3つのDRv6対立環伝子、DRB1\*1301, DRB1\*1302, およびDRB1 1401 に共通に存在する配列を開業する、プロープGRXGB("1-DE") または CRX23 ("A-H") にハイブリダイズせず、DRx6ではなくDR3 であることが示唆される。

これを研究するために、このサンブルをDR01特質的プライマーGW48/CRX37で増 傾し、0R3,GH125("Y")およびCRX50("K-GR") について SSOで探査した。約100 ng の昭数系ゲノムDWA を、例1の記載のようにDR01特質的プライマーGW46/CRX37で 堆幅した。堆幅般配系OMA そさむ各フィルター(サンプルA〜F)をIRBI特異的 HLA ORB プライマーで増幅した HTC OHAを含有する対効フィルター(サンプル↑〜11)と同時にハイブリダイズさせた。フィルターはすべて例1に起戦のようにして類似した。結果は関8に示す。 冬フィルター対は、示した SSOプローブにハイブリダイズさせた。サンプルは、

(1) No DNA constol; (3) DRI HTC "KAS9003"; (3) DR2 HTC "SCHU"; (4) DR3 HTC "QBL"; (5) DR4 HTC "BSM"; (6) DR3 (DR4)(1) HTC "SPACH"; (7) DR46 HTC "CMV"; (8) DR1 HTC "MOU"; (9) DR46 HTC "SPACH"; (10) DR9 HTC "DKB"; (11) DR44 DHTC "SHY"; (4) No DNA constol; (8) Raji; (C) 616; (D) Bopulo (3) RM1: およ(ア作) R3121 である。

ハイブリダイゼーションおよび洗浄工程後、結合したブローブは抑強化学ルミネッセンスで検出された。

図9に示すように、ReJI, 616, RkJ、およびRS225 は"Y" および"K-66"の両者にハイブリダイズし、これはそれらを0R3(0Re17)に分類させる。狭約すると、ReJI、RkJ、およびRS225 はReJIでは、およびRS225 はReJIでは、まなよびRS226 はReJIでは、まなよびRS226 はReJIでは、まなよびRS226 はReJIでは、まなよびRS226 はReJIでは、まなよびRS226 はReJIでは、まなよびRS226 はReJIでは、またであるから、それらが同じ DR8タイプを有していても驚くべきことではない。 知知系616 はDR1/ORe17 として分類され、8egultはDR7/ORe17 として分類されるが、上述のように、8egult細胞系は下-0でエピトープを有するDR81 は103 対立遺伝子を含有する。以前には、大部分の DRe11型根据は、"F-DR"エピトープを有するDR81対立遺伝子を含有することが認められていた。したがって、6egult細胞系は DR911型としては、異常なDR81対立遺伝子を含有する。

相燃系サンプルに加えて、3つの概なる起源からのDM を増縮し、分類した。 一つの起源は、Canter for Study of Human Polymorphism (CEPH, Paris, France) からの一連の無関係なヘテロ接合機体の特別ゲノムDMA である(サンプル 656~ 863)。他の起源は膀胱環境者の落組織のRRNAから作成したcDNAであった(サンプル 2420, 2448, 2640, 2671, 2766)。正常ヒト膀胱網因はクラスエ分子を発現しない が、名種原網路ではクラスエ分子の発現が起発されている。

傾りのサンブル(PSY) は、口内稀糠で、QNA を構製することなく直接 HLA DRN について増縮した。完全なパタイピングには、サンブルを一般的 QRBプライマー GR46/50 およびQRB1特異的 PQRプライマーGH46/CRX37の両者で増縮する。一般的 プロープで増縮された QNAサンブルを含有するフィルタードを第一のパネルのプ

ローブ(夜4)で設置し、DRST待算的に増幅した ONAサンプルを含有するフィルター片は第二のパネルのブローブ(表5)で認定した。

表3および表8とのハイブリダイゼーションのパターンの比較により、サンプルの ORB型を明確に誘導することができる。ヘテロ指合サンブルの型判定の結果を図9に示す。図9では、プローブにハイブリダイスするサンブルは+の総合で示す。翌朝はサンブルが特定のプローブとハイブリダイズしなかったことを指示する。

サンブル 655~863 はCEPKから接供された純粋なゲノムDRA である。サンブル\*\*PSK\* は口内静障から連接増幅されたサンブルである。このサンブルは 200 μ l の 5 % Cheiex 中、95℃に5分間20歳した (8Inger-Somら;Ampilfications 3: 11,1989)。この海液約50 μ l を高接、反応容量 200 μ l 中で増幅させて、一般的 0R3 およびOR81特闘的増幅反応をサンブルにつき30サイクル実施した。

サンプル2428, 2448, 2540, 2671, および2758は、膀胱速CDNAプレバレーションから増植した。房胱速サンプル2428, 2448, 2540, 2671, および2758は、SSO GH125, CX X60, CRX56, およびGH54では分析しなかった。これらのプロープは、ORBI 特異的プライマーGH46/CRX37による増極を要求するからである。CRX37 はイントロン配列に由来するので、CDNAの増幅には使用できない。NDは過定していない。

口内緒接サンプル、PSV は0R40w14(0R81±0404)および0Re11 である。

これらのデータは本システムによれば、様々な起源から、衛準権製がノムONA から、IRMAから含成されたcDNAから、異常な起源だとえば口内終俸もしくは1本 の毛がらの、ヘテロ接合ONA のタイピングが可能であることを示している。

#### 918

## **ORB タイピングー逆ドットブロットフォーマット**

本発明のこの実施販券においては、 DRBプローブは頂に母定され、増幅された 様的DNA は誤結合プローブにハイブリダイズさせる。タイピングプローブのセットは、各プローブが、セット中の他のすべてのプローブと同じ速度および堪識度 で特異的様的配列にハイブリダイズする(そして同じ洗浄条件でハイブリダイズ したままである)ように設計される。PCR Protocolと置する本(参考として本明 場響に導入する)に記載されているように、増幅に用いられる PCRブライマーは、 関に第合したプローブにハイブリダイズした増極DNA が容易に検出できるように、 ピオチン化される。

一実施修掌においては、検出は、関語含プロープにハイブリダイズしたピオチン化、増幅DMA と、ストレプトアビジン(SA)接合適準つサビベルオキシダーゼの反応によって行われる。 すなわち、MiP はS-A-ピオチン相互作用を介して増幅されたBMA に結合され、よく知られた多様な手段での発生、たとえばテトラメチルベンチジンの戦化によるたとえば層色化合物の発生(米価特許第 4,789,830号参
図。参考として本明相響に導入する)に使用できる。

ブローブは関に任家の手段で固定できるが、好ましい方法には、長さ約13〜26のオリゴヌクレオチドブローブの、はるかに長い配列ポリーがによる「ティリング」がある。生成レたポリーがディルはついで隣上のアミノ様と反応させてプローブを関に共有結合で固定できる。この反応は紫外線照射によって促進される。

ターミナルデオキシリボヌグレオデジルトランスフェラーゼ(fdf, Ret)Iff 8/o chemicals:以下の反応には約120単位/エ1、100 pso(/エ1 に相当の濃度が規定される) はプロープよにボリー(f デイルを動製するために使用できる。またテイルをもつプロープは、布取の PMメンレゼイザーで合成することもできる。しかしながら、 PMメンレゼイザーでディルをもつプローブを作成する場合は、主としてデイル構成に貸ましくない来熱チェーンターミネーションが総こらないように、プローブの6/実施にデイルを配置すべきである。

TdT反応は1× TdT塩、200 pmoIのオリコヌクレオチド、 800μM dTf、および60単位の Tdfを含有する約 100μl の容置で行われる。10× TdT塩は 1000mM カコジル散カリウム、10 mM塩化コパレト、2 mMジチオスレイトール、250mM Tris-Cl, pH 7.6であり、Roychoudhury 8 Yu:Weth Enzymol.65:43-62 の記載に従い(この記載は参考として本明部書に導入する)報道する。8 mM dTTP の10×保存治液(NeOHで pH 7に中和)を路設するのが便利である。

ToT 反応は37でで2条時行い、ついで 100 u | の10 mM EDTA PH 8の系列により停止させた。テイルをつけたオリゴヌクレオチドの最終運度は1 u M (1 pmo1/ u I ) であり、ホモポリマーテイルの長さは約 400残盗である。テイルの長さは 4TTP とオリゴヌクレオチドのモル比を調整することによって変化させることができる。テイルをもつプローブは使用時まで一20でで保存できる。

逆ドットプロットフォーマットには2種類の好ましいナイロン様がある。 すな

#### 转表平6~505625 (14)

かち stodyne<sup>TA</sup>ナイロン酸、孔線0.45ミクロン (Paul M) および8lotrans<sup>TA</sup>ナイにン族、孔像0.46ミクロン(ICIM) がある。プローブは、BioRadWのドットプロット被乗 8lo-RotTMを用いて。裾めて感慨に禁止にスポットできる。名プローブは終土、独自の分散した知道にスポットする。デイルをもつプローブそれぞれ約GーIの近日といる予めの一100 μ1 のTE展衝球液と添きしたのち、ドットプロット接端に適用する。ドットプロット接続に適用する。ドットプロット終、賃を接続関係に取り紙上に乗いて適利の液体を吸い取らせる。

ついて、関係、たとえばStratagene製のStratalinker<sup>TM</sup>光線ボックスのような 紫外線ボックスの内側に競性、出力50~60ミリジュールに開出し、テイルをもつ プローブをナイロン膜に固定化させる。解壁に洗浄して(ハイブリダイゼーショ ン別波中約15分)非結合プローブを除去し、ついで関をビオチン化 PCR電物とハ イブリダイズさせる。 PCR超物 0.5~1 ピコモル(典型約な PCR電物 100 ロ ロ 4のロー2分の1)を各プローブパネルに加えてハイブリダイズさせる。約50 ムーのストレブトアビジンー西洋ワサビベルオキシダーゼ(SAHRP、RECEから布版 最を入手できる。Asoli Type TOO のBNA タイピングキットの接派マニュアル参照、 参考として本明細盤に導入する)接合体をこの時点で添加するのが便利であるが、 素鉛条件下の洗浄について別類にSAHRPの変調でのインキュペーションおよび洗 浄を行う方が反呼なシグナルが得られる。

ハイブリダイゼーションは通常、水浴中、 0.5% SDSおよび3×~5×6SPG、 連常は4×からなるハイブリダイゼーション繊衝液を用いて、50℃で30分間行う。 緊縮条件下の洗浄は、水浴中、 0.1% SDSおよび1×SSPCからなる洗浄液を用い て、50℃で16分間行う。変温で1×PSS による後洗浄を30分行うとシクナル量を 増発できる。

逆ドットプロット法のためのビオチン化プライマーおよび本発明の他の有用な プライマーは以下に示す。しかしながら、一方または時間のプライマーを増修中 にピオチン化することもできるし、またプライマーは任意の検出フォーマットで 増幅に使用してもよいことに留意すべきである。

```
7917- 80 D.No.
                                        122
 CRYII
         SEO TO NO: 62
                         5-TCTAGAAGTACTCTACOTCP-3
                         B-CCCGATCCTYCOTOTCCCCACAGAGAGCAGG-3'
 CRX28
         SEQ ED NO: 67
  CRX29
         SEQ DO NO: 68
                         B-CTCCCCCAACCCCGTACTTCTCTCTCCA-1
 DRSD
         SEO ID NO: 73
                         B-GAATTCCCCGCCCCCCCCCCC
         SEQ ID NO: 107
                         B-GAATTCCCGCGCCCCCCCCCCCCT-Y
 DRB30
 DKH132
         SEQ 03 NO: 228
                         9-COCCOTAGTTGTGTCTCCACACGC-3*
 DB 259
         SEO IO NO: 95
                         B-GAATYCCCYICOCCGCGCTCACCTCG-3
         SEQ 113 NO: 96
                         B-GAATTCCCGCCGCGCGCGCTCACCTCCCCC-3
```

日はピオチンである。CRX11 は、DR3 DR5 およびORM (1883よび14) ハロタイプのDR1増二エクソンを増幅するためのISOと使用するように投計されたち間プライマーである。CRX28 はピオチン化を嫌プライマーのIRA CRX29 はピオチン化を嫌プライマーのRO7 である。CRX30 はピオチン化右嫌プライマーCRX37 である。CRX30 はCRX37 の配列を含著し、CRX37 とは異なりORE30 はDR7 ORB1配列を開幅できる以外はCRX37 と同じDR81制度を育する右横プライマーである。DR3152はDR7 および DR9 対立協会子のための群特異的右端プライマーである。DR216 および DR20はDR81制度の関係の配置をCRX2 およびDR9 にまて延長するように放計された同じく

逆ドットプロット法に使用されるテイルを付したプローブのハイブリダイゼーション模域を以下に示す。 Xはイノシンである。 DR801/CRX60 のように 2つのプローブ必折示されている場合は、最初の名称はチイル付きプローブのハイブリダイゼーション模域 (示されている) を表し、第二の名称は HRP機能非テイリングプローブを表示する。

```
经初级
プライヤー
           Sec. ID No.
                           S-CCTGCTGCGGAGCACTG
GH34
                         U SUCCIOTTOCAGOACTO
           $80 ID NO: 85
                           S'-CABACGTAGAGTACTCC
GHS6
           SEO ID NO: 86
            SEQ ID NO: 87
                           5'-CATGUTTAACCTGCTCC
                           SAGAAATAACACTCACCCOTAG
GH102
           SEO 20 NO: 89
                           S'TGACACTCCCTCTTAGGCT
           SEQ ID NO: 90
QH104
011105
            SEQ ID NO: 91
                         U 5-CTTOCAGCAGGATAAGTATO
OHIM
           SEO ID NO: 91
                           ADTITIONATIABONDINADTITICA
                           5-CAGTACTCCTCATCAGO
           SEQ ID NO: 93
GH122
                         ช
                           5-CTOTCCAGGTACCGCAC
            5EQ TO NO: 94
                           5-CAAACITAAGCTGCCAC
DRAGIACREX 60 SEQ TO NO: 79
                            5-CATCCTGGAAGACGAGC
DRE02/CRX06 SEQ TO NO: 61
DRBOS/CRX35 SEQ ID NO: 71
                         U
                           SVCCTGTCTTCCAGGAAGT
                         U 5'TOACACTTATACTTACC
DREGACRX49 SEQ ID NO: 74
DRB05/CRX34 SEQ ID NO: 70
                         U 5'-CTCAAACTTAACCTCCTC
DRB06/CRX04 3EQ ID NO: 60
                         U 5'-GAGCAGAGGCGGGCC
                           5'GACTTCCTGGAAGACGA
DRB07/CRX68 SEQ ID NO: 84
DRBOWCRX12 SEQ ID NO: 63
                           5'-AGCTGGGGGGGGCCT
DR809/CRX30 SEQ 10 NO: 75
                         U SICACCOGGCCCCCCTCT
DRBIOCRX53 SEQ TO NO: 76
                         U 5'-GADCAGAAGCGGGCC
DRB11/CRX15 SEQ ID NO: 64
                         U S'ACCTCOCCCCCCCTC
DRB12/CRX52 SEO ID NO: 81
                         13 STACATOCTOGAAGACAAG
                         U 5'ACATOCTOGAAGACAGG
DRB13/CRX63 SEQ ID NO: 8Z
                          U 5'-GCGGCCTAGCGCCGAGT
DRB14/CRX61 SEQ ID NO: 80
DRB15/CRX56 SEQ ID NO: 77
                         S 5'-CGGGTTOQTQAQAQCT
                           5'-CGGGTTGTGGAQAGCT
DRB16/CRX57 SEO ED NO: 28
                         8
            SEQ ID NO: 97
                         S S-TGACACTTATACTTACCOTC
DRB19
DRR2A
            SEQ 20 NO: 98
                          $ 5'-CTCAAACTTAACCTCCTCC
                            5-GAGCAGAGGGGGG
DRB21
            SEC ID NO: 99
                          U 5'-GCCTOTCTTCCAGGAAGT
```

```
ORB23
            SEQID NO: 161 U S'-OCCCOCTTCTOCTC
DRE24
            SEQ 10 NO: 102
                         U 150AGCAGAAGCXGGCC
                          U F-CATCCTGGAAGACAGG
ORBIS
            SEQ 30 NO: 103
                          U SCATOCTGGAAGACAGGGGGG
DRR16
            SHO ED NO: 104
            SEQ ID NO: 105
                            S'-ACATCCTCGAAGACAAGC
DRB 17
            $EQ ID NO: 107
                           5'-ACCTCGGCCCKCCTC
DR328
DRB31
            SBO ID NO: 108
                         8 SACTOCCOTTTATGGATGTATC
            SEQ 50 NO: 109
DRB32
                            5'-TOTCCAGOTACCOCA
DRB33
            SEQ ID NO: 110
                            5'-ACTEATGTTTAACCTGCTCC
                            S'-CTCATOTTTAACCTOCTCC
DRB34
           SEO ID NO: UL
DRB35
            SEQ ID NO: 112
                            5'-TOTCGCCGAGTCCTGG
DRB36
            SEQ TO NO: 113
                         s
                            5'-COCCTOTCTTCCAGGAAGT
DREE37
           SEO ID NO: 114
                           S'-COCCTOTOTOTOCAGGAAGT
DRB36
           SEQ ID NO: 115
                         U STOCACCCCCCCCCCCCTTCT
DRB39
           SEQ ID NO: 116
SEQ ID NO: 117
                            5'-GAGCAGAAGCGGGC
DR.840
                          U SIGAGXAGAAGCXGGCC
DRB41
            SEQ ID NO: 118
                           5-GGCCCGCTTCTGCTC
                         S 5'-GACGGAGCTOGGGGGGGGG
DRB62
           5EQ ID NO: 119
                           5'-GACCOAGCTOGGGGGGCCT
DRB43
           SEQ ID NO: 120
DRB44
            SEQ DO NO: 121
                            $1GACCTCCT0GAGCGGAGG
DRB45
           SEQ ID NO: 122
                         s
                           5'-GAGCGGAGGCGTGCC
DRB46
           SEQ 20 NO: 123
                           5'-TCAGACGTAGAGTACTCC
DRE47
           SEQ ID NO: 124
                           5'-TCTTGCAGCAGGATAAGTATU
DRB48
           SEQ ID NO: 125
                         S 3'-CACTCATGTTTAACCTGCTCC
DRB49
           SEQ ID NO: 126
                         U 5'TCAGACTTACGCAGCTCC
DRB50
            SEQ 10 NO: 127
                         U S-TCAGACTTAAGCAGCTCC
DRB51
           SEQ ID NO: 128
                         U 3'-OAGCAGAGGCGGAGC
DRB52
           SEQ ID NO: 129
                         M STOAGCAGAAGCGACGCC
DRE53
            SEQ ID NO: 130
                         U S'-GGCCCCCTTCTGCTCCA
DRB54
           SEQ 10 NO: 131
                         U S-GCOGCCCCCTTCTCCTC
DRBSS
           SEQ ID NO: 132
                         U 5'-GAGCAGAAGCGAGGC
DRB36
           SEQ IO NO: 133
                         U S-GGAGXAGAAGCXGGCCG
DREST
           SEQ ID NO: 134
                         U S-CCACCGGGCGCGCTCT
DRBSE
           SEQ ID NO: 135
                         U $-CATCCTGGAAGACAGGCG
DRBSP
                         U F-CATCCTGGAAGACAGAGGG
           5EQ ID NO: 136
DRB60
           SEQ ID NO: 137
                           F-GGCGGCCTAGCGCGAGT
DRB61
           SEO 10 NO: 138
                         U 5-ACCTCCTGGAGCGGAGG
```

## 特表平6-505625 (15)

DRB62	SEQ ID NQ: 139		J'-GACTTCCTGGAGCGGAG					- 1
DRB63	\$2Q ID NO: 140		S-CATCCTGOAGCAGGCG	DRE100	SEQ ED NO: 176	S	S-TICTIGCAGCAGGATAAGTATGAG	ž
DRB64	SEQ ID NO: 141		5'-ACCTCGGCCCXCCTCTG	DREIOL	SEQ ID NO: 177	5	5'-CTCCCOTTTATCOATCTATC	
DRB66	SEQ ID NO: 142		S-UAGCAGAAAGCGGG	DRB 102	SEQ ID NO: 178	\$	S-CAOTACTCCTCATCAGGC	
DRB67	SEQ (D NO: 143		5'-GAGXAGAAGCXGGCCG	DRBICS	\$EQ TO NO: 179	3	5-CTOTOCAGGTACOGCA	
DRB58	SEQID NO: 144		s-ccroseccecererec	DRB104	SEQ ID NO: 110	U	5'-ACCTCGGCCCCCCCT	
DR.B69	SEQ ID NO: 145	_	#-CCTCCTGGAGCGGAGG	DRH105	SEQ ID NO: 111		J 45-GAGGGGGGGGGGGAG	
DRB10	SEQ ED NO: 146		5-CGCCTGTCTTCCAGGATG	DRE106	5EQ ID NO: 182	Ų	5-AGAGGCGCGCGAGGTGGAC	
D#0871	52Q ID NO: 147		F-TTCTTGCACCAGGATAAGTATG	DR#107	2EQ 1D NO: 163	3	\$'-AGAAGCGGGGGGGGG	
DR1072	\$8Q ID NO: 148		F-COCCTOTCCTCCAGGATO	DXBIQ	SEQ ID NO: 184		5-GAAGCGGGGCCGGG	
DRB73	SEQ ID NO: 149		S-AGAAGCGGGGGGGGGGTG	DRB109	SEQ 10 NO: 185		5'-GAAGACAGGCGGCCCTGG	
DRB74	SEQ ID NO: 150		F-GAGCAGAGXCGGGCC	DRBIIO	SEQ ID NO: 186		F-GCCTGTCTTCCAGGAAGTCC	
DRB75	\$EQ ID NO: 151		5-GAGCAGAGAGCGGC	DRB111	. \$EG ID NO: 183	U	FICTCAGACGTAGAGTACTCC	
DRB76	SEQ ID NO: 152		\$-CTTCTGCTGCAGGAGG	DRB112	SEQ ID NO: 188	5	5-GCCTGCTGCGGAGCACTGG	
DRB17	SEQ ID NO: 153		I-CTCCTOGAGCAGAAG	DRB[13	2EQ ID NO: 189	8	F-GACCTCCTGGAAGACAGG	
DRB78	SEQ ID NO: 114		J-CCTCCTGGAGCXGAAG	DRB114	SEQ ID NO: 190	U	5-CCTGTCCTCCAGGAGGTC	
228,3979	SEQ ED NO: 155		J-CCTCCTOGAGCAAGAAG	DRBi15	SEQ ID NO: 191	U	5'-ACGOUGTTUOTGACAGCTT	
DRESO	SEQ ID NO: 156		5'-COOCCCCCCCTCTCCTC	DRB116	3EQ ID NO: 192	U	5-ACGGGGTTGTGGAGAGCTT	
DRBEI	SEQ 10 NO: 117		J'-COCOCTOTGOAGAOCT	DRB117	SEQ ID NO: 193	υ	5-ACCIGCTGTGGAGAGCTT	
DRB#2	SEQID NO: 158		S-CITCIGCTCCAGGAGGTC	Drbiis	SEQ ID NO: 194	5	5'-GAGGCGGGCCGAGGT	
DRBSI	58Q ID NO: 159		F-ACCTCCTGGAGCAGAAG	DRB(19	5EQ ID NO: 195	U	F-GAGGCGGGCCGAGGTG	
DRB84	SEQ ID NO: 160		5'-GOCCCCCCTCTGCTC	DRB120	SEQ ID NO: 194	υ	\$-GAGGCGGGCGAGGTGGA	
DRB85	SEQ ID NO: 161		5-GCCCGCCTCTGCTC	DRB121	3EQ ID NO: 197	U	1,-GYGGGGGGGCCCYGGAGGAG	
DRB86	SEQ 10 NO: 162		S-GGCCCGCCTCTGC	DRB122	SEQ ID NO: 198	IJ	5'-AGAGGCCCCGAGGTGGAC	
DRIB87	SEQ ID NO: 161		5'-GAGGCGCGAGGT	DRB123	3RG ID NO: 199	7	5-OGCGGCCTAGCGCCGAGTA	
DRESE	SEQ ID NO: 164		J-GAGGCGCGCGAGGTG	DRB124	SEG ID NO: 200	て	5-CCACXCOGCCCCCCTTCT	
DREST	SEQ ID NO: 161		5'-BAGGCGCGCGAGGTGGA	DRB125	SEQ ID NO: 201	T	s'-GAGGCGGGCGGGT	
DREW	SEQ ID NO: 166		4-AGAAGCCGGGCCGGGT -	DRB 126	SEQ (D) NO: 202	T	5'-ACCGCGGCCCGCCTC .	
DRB91	SEQ ID NO: 167		5'-AGAAGCOOGGCCGGG	DRB127	SEQ ID NO: 203	T	5'-OAAGCGGGCCGGGT	
DRB92	\$8Q (D) NO: 168		S'-COOTTOOTOADAT	DRB128	SEQ ID NO: 204	T	5-ACCGCGGGGCCGCTTC	
DRB93	95Q ID NO: 169		1'-GGGGTTOTGUAGAGCT	DRB129	SEQ to NO: 205	Ţ	S-ACTTCCTGGAAGACAGG	
DRB94	SEQ 10 NO: 176		5'-ACCTCGGCCCGCCTC	DRBIN	SEQ ID NO: 206	T	5-COCAAGTCCTCCTCTTG	
DRB95	SEQ D NO: 171		3'-CATCCTGGAAGACAGGC	DRBISI	SEQ ID: NO: 207	т	5-CAAGAGGAGGACTTGCG	
D#L896	\$EQ 30 NO: 172		5-GAGCAGAAGCAGGCC	DRB152	250 ID NO: 208		5'-GAAGACAGGCGGGCCCTG	
D8897	SEQ ED NO: 173		3'-GGCGGCCTAGCGCCGAGTAC	DRB133	203 (CD NO)	τ	5'-AAOACAGGCGGGCCCTGG	
DR.89#	8EQ ED NO: 174		S-TGTAGGACCTTCTGTCCG	DRB134	SEQ ID NO: 210	Ŧ		
DRB99	SEQ ID NO: 171		5'-GTAGGACCTTCTGTCCG	DRB135	SEQ ID NO: 211	T	F-ACTTCCTOGAAGACGAGC	
		•		DRB135	SEQ ID NO: 212		5"ACATCCTGGAAGACAOOC	

DRB137	SEQ ID NO: 213	T 5'-GCCTOTCTTCCAGGATG			
DRB138	SEQ ID NO: 214	T 5-GCAGAAGCGGGCGCG	DRB176	28Q ID NO: 252	2,-caxaccccacctcta
DRB139	SEQ ID NO: 215	T 5'-COCOOCCCOCTTCTGC	DRB177	58Q ID NO: 253	\$'-GCGXOGCCCGCCTCTG
DRJB140	\$80 ID NO: 216	T 5'-GCAGAGGCGGGGGGGG	DRB17s	\$50 ID NO: 254	5'-GGOGOAGTTCCGGGGCG
DR9141	SEQ ID NO: 217	T 5'-COCOOCCCOCCTCTOC	DRE179	\$EQ ID NO: 255	S-CCCCCCGTACTCCCCC
DRB142	SEQ ID NO: 218	T 5'-0CAGAGGCGGGCGAG	DRB180	SEQ ID NO: 256	5'-XCCTGATGCCGAGTACTG
DRB143	3EQ ID NO: 219	7 5'-CTCGGCCCGCCTCTGC	DRBist	SEQ (D) NO: 257	5'-XCGGOOCTGTGGAGAGCTT
DRB144	5EQ IO NO: 220	T 5'-0CGGAGGCGGGCCGAG	DRB142	\$200 DO: 254	5-CTACOUDGCTGTGGAGAG
DRB145	SEQ 10 NO: 221	T 5-CTCGGCCGGCCTCCGC	DRBIAN	52Q ID NO: 259	5'-CTACGOCXCTGTGCAGAG
DRB146	5BQ ID NO: 222	T 5'-CTCCGCTCCAGGAAGTC	DRB184	ZEQ ID 140: 260	5-OTTCCOOGCGGTGAC
DR0147	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	T 5-COGGOTTOCTOAGAGCT	DRB185	SEQ ED NO: 261	5'-GGGGGAGTTXCGGGG
DRR148	SEQ ID NO: 224	T F-COCOGTTOTOGAGAGCT	DRB185	SEQ 10 NO: 262	S-COTCACCGCCCGGTAC
DRE149		T P-COGGGCTGTGGAGAGCTT	DR#187	SEQ 10 NO: 263	S'-CGTCACCGCCCEXTAC
DRB150	SEO ID NO: 226	5'-TOTCCACCICGCCCGCCCCT	DRBISS	SEQ ID NO: 264	5'-CACCCCTCATXGCCC
DRB153	SEQ ID NO: 229	F-GAATTCCCAGCTCACACGGGACT	DRB189	SEQ ID NO: 265	5'-GCGGGCCGCGGTGGAC
DRB154	SEQ ID NO: 230	5-00TGTCCACCGCGCCCCCCCC	DR.B190	SEQ ID NO: 266	F-CAGAGECXGGCCGCGGT
DRB155	SEQ ED NO: 231	J-AACCCCOTAGTTOTGTCTCCACAC	DREISI	\$20 ID NO: 267	5'-GTTXCGGGGGGGTGAC
DRB155	SEQ ID NO: 232	3'GGGGGAGTTCCGGG	DRB192	255 :OH CII OHS	3'-TTCCCGGCGGTGAC
DRB157	SEQ ID NO: 231	5'-CCCGGTACTCCCCC	DRB193	SEQ IO NO: 269	1-GGGGAGTTCCGGG
DR#158	SEQ ID NO: 234	5'-OGCOOCCCGCCTCTG	DRB194	SEQ 10 NO: 270	5'-TCACCGCCGGAAC
DRB159	SEQ ID NO: 233	s'-ccacaeccccccctc	DRB195	SEQ 20 NO: 271	5-AGATACTTCTATAACCAG
DRB160	5EQ ID NO: 236	s-ccaxdacccccctctac	DRB196	\$8Q ID NO: 272	5-AGACACTTCTATAACCAO
DRB161	SEQ ID NO: 237	F-CCAGCGGCCGCCTCTGC	DRB:97	SEQ ID NO: 273	5-CTOOTTATAGAAGTATCT
DABI62	SEQ ID NO: 218	P-GCAGAAXCGGGCCGCXGT	DRB198	SEQ ID NO: 274	S-CTOTCGCCGAGTCCTGG
DR8163	SEQ ID NO: 139	F-GCAGAAAGCGGGCCGCXOT	DRB199	3BQ ID NO: 275	S'-OGGCCCCTAGCCCCGAGT
DRB164	SEQ ED NO: 240	5'-CAGAAGCGGCCGCG	DREEO	SEQ ID NO: 276	S'-GCAGAAAGCGGCCCCCCCC
DR#165	SEQ ID NO: 141	3'-ACCTXGGCCGCCXCTGC	DRB201	SEQ ID NO: 277	5'-GCGXCTGTCTTCCAGGATG
DR8166	SBQ 00 NO: 242	5'-ACCTXGGCCGCCXCTG	DRB202	SEQ ID NO: 278	S'-COXCTOTCTTCCAGOATO
DR.B167	SRQ 10 NO: 243	5'-GOAGCAGAAACGOOCCG	DRB203	SEQ ID NO: 279	S'-ACCGXGGCCCGCCTCTG -
DRUB168	SEQ ID NO: 244	S'-GOAGCAGAAACGGGCCGC	DR2204	SEQ ID NO: 280	5'-CCGTCACCGCCCGXTAC
OR18169	SEQ IO NO: 245	5-GCAGAAGCGGGCCCGC	DR8205	SEQ TO NO: 281	F-OGGGAOTTCCGGGG
DR3170	3EQ ID NO: 246		DR.5206	SEQ ID NO: 282	5'-TCACCGCCCGGAACTC
DRBITI	\$EQ ED NO: 247	5-GTCCACCTCOGCCCG	DRII 207	SEQ IQ NO: 283	S'-TOACACTTATACTTACCCTCC
DRB172		. 5'-CGGGCCGCGGTGOAC	DRB201	SEQ 10 NO: 284	S'-TTGAAGCAGGATAAGTTTGAG
DRB (73	SEQ ID NO: 248 SEQ ID NO: 249	5'-CGCCTCGGCTCCAGGAG	DRB209	SEQ ID NO: 285	\$-CTTGAAGCAGGATAAGTTTG
DRB174	SEQ ID NO: 249	S'-CTCCTGOAGCAGAGGCG	DR#210	SEQ TO NO: 286	5-GAATTCCGGGGGGGGGGTCA
DRB175		s-Accocagecagectet	DRB211	SEQ ID NO: 287	5'-GAATTCCCGCGCGCG
DV0113	125 10M CD QBS	S-CACCTXGGCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	DRE111	884 : CM CE OS2	5'-0AATTCCCGCGCGCGCTCAC
					a . m. a. r a - manuschen chefter (100 ft ft ft ft ft

Danati	SEQ ED NO: 289	4-ATGACACTCCCTCTTAGGGTTG
D9.8214	SEQ ID NO: 290	5'-ACATCCTGGAAGACGAG
DRB215	SEQ ID NO: 191	5-CCGCTCCCTCCCATTGAA
DRB7.15	SEQ 113 NO: 292	SYTTCAATOAGAQQGAGQGG
DRB217	3EQ ILI NO: 293	5-CATECTOGAAGACGAG
DRB21#	SEQ 33 NO: 294	5'-GCTOUTCTTCCAGCATG
DRB219	SEQ ID NO: 295	5'-COCTCGTCTTCCAGGATG
DRB270	SEQ ID NO: 296	S'-GCTYLTCOECGAGTCCTUG
DR#221	SEQ ID NO: 197	3'-CCTGTCGCCGAGTCCTGG
ORB222	SEQ 10 NO: 298	5'-CTGTCCAGGTACCGCA
DRB225	SEQ ED NO: 299	5'-GGCGGCCTAGCGCCGACTCA
DRB224	<ul> <li>SEQ ID NO: 300</li> </ul>	2-CCACKCGGCCCCGCTTTTT
DR#275	SEQ ED NO: 301	3'-GAGGCGGGCCGCGGT
PRB226	SEQ ID NO: 302	5'-ACCGCGGCCCGCCTC
DRB237	SEQ ID NO: 303	5'GAAGGGGGGGGGGT
DRBZ2#	2EG ID NO: 304	5'-ACCGCCCCCCCCTTC
DRB229	SEQ ID NO: 301	F-ACTTCCTGGAAGACAGG
DRB230	SEQ ID NO: 306	5'-GACCTCCTGGAAGACAGG
DRB23)	SEQ ID NO: 307	5-ACATECTOGAAGAÇAAGC
DRB232	SEQ ID NO: 308	S-GACATCCTGGAAGACAAGC
D&B233	\$EQ 10 NO: 309	F-ACATECTGGAAGACAAGCG
DRB300	SEQ ID NO: 310	5-DAATTCCCGCGCGCGCGCTCACCTC
DR8305	SEQ ID NO: 311	5-GAATTCACAGGGACTCCAGGCC

予値試験の結果、「S」とマークレた上記プローブは他の「U」とマークした上記プローブよりも好ましいことがわかっている。「T」とマークした上記プローブはおだ試験されていない。

好ホレい光ドットプロットについてのハイブリダイゼーションパダーンおよび 特異性(1989対立遺伝子セット)を以下に示す。「特異性」のカラムに使用される「X」のマークは、\*6の様の始めの2つの数字で指示されるすべての対立遺伝子を包含することを表す。

XCh:: Z AV (no. 86)		按無性 DRB1*0102, 1201; DRBS
MNIM	GHIL	DRB4*0101
MNIM	DRB101	DRB2*0101

#### 例9 逆ドットプロットタイピングキット

・電池かつ機能な流ドットブロットハイブリダイゼーションフォーマットが除入 された。HA DRBダイビングキットは、対立選続子待費的な増積を含めた精密なけ フタイピングを進めるに先立ち、サンブルの単純かつ迅速なブレスクリーニング を行うために検針されたものである。このキットは、増幅財素、機性対限として が限されるRM 、プローブが予め間定化されているナイロン片、頻色検出対象、 試験検討よび排示機を包含する。

タイピングは2個の機能反応を用いて行われ、一つには BR8一般プライマー、 他方には BR6時度的プライマーを使用した。このプライマー対は、例じ熱サイク ル条件下に域係し、したがって、2つの反応は周時にも実施できる。2つのパネ ルのプローブや、一つは各機幅度のに特別的で、逆ドットプロットハイプリダイ セーションフォーマットに使用された。プロープのバネルはそれぞれ、取扱いを 登場にするため、単一のナイロンストリップ上に固定化した。

ビオチン化プライマーを増級反応に使用したので、上記例3に超減したような比色級定を用いる以後の娩出が可能となった。使用された BRB場隔プライマーはCXX28(SEQ 10 M0:69) であった。DR31機偏プライマーはCXX28(SEQ 10 M0:69) であった。DR31機偏プライマーはCXX28およびCXX37(SEQ 10 M0:73) であった。両行ットのプライマーとも上記例3日記録されている。

2つのプローフバネル、すなわち一方は DRD接続の技幅系物とのハイブリタイゼーション用、他方はDRDI特異的機能の境隔高物とのハイブリタイゼーション用は、以下に示す。各プローブの又クレオチド説列は配列掲載68に掲げるが、各プローブの配列的定番号(SEO ID NO) は以下に示す。

W-I-F	CRX6NURSOL	DRB1*0101, 0102, 0103
W.P.R	CITTO4	DRB1-1501, 1502, 1601, 1602
QDY YOU	001 BJRCI	DRB\$*0101, 0102, 0201, 0202
K-D-P	GHILL	DRB1*0901
YSTS	DRB46	DRB 1°030X, 110X, 139X, 140X
YSTO	OH102	DRINT+080X, 1201
VH	SPEEC	DRB1*040X
Q-YK	DRBIS	DRB#*070X
27	DRB2Q	DRB1*1001
l.R.S	C0H57	DRR3*0101
LL-S	GH58	DRR3*0201,0202,0301
R-DR	DR837/DRB109	DRB1*0801, 0402, 1101, 1104, 1601, PEV
		DRB5*0101, C102
P-DE	CRX63	DRB1*1103
IDB	CRXOA/DREEDS	DRB1*0103, 0402, 1102, 1301, 1302
I-DK	DRE27	DRB1+1301
RR,	DRB45	DRB1*1001
P~RR-P.	DRB61	DRB1*0901
I-A	DR863	DRB1+1501, 1502; DRB5+0201, 0202
Y	DRB103	DRB1*0301,DRB3*0101
E	DRESION	DRRI-110X
\$	DREMO	DRB1*0405, CRO1, 0803, 1303
A-H	DRB112	DRB1*1401, LY10
VS	DRRSS	DRB1*070X, 0901, 1201; DRB3*0101,
R		0301
ĸ		DRB1*0101, 0102, 0404, 0405, 0408,
к	Tower	DRR1*0406
RB		DRB1*0403, 0406, 0407
RRE		DRB1*1401, LY10; DRB4*0101
IDR	DRB72	DRB1*0701.0702
I-DR	DRB95	DRB1*0803, 1291
KGR	DILLD / 2	DRB1*0301, 0302; DRB3*0101
DR	DREILI	DR31*1602
G (pcs. 86)		第2条型
V (pos. 86)	~	表 5 美 · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
- than mat	•	S. J. W. 74.

线原生

<u> 48</u>

IKA::I

#### BRBは壁のためのプローブパネル

	<u> </u>	Sea. 113 No.	AAR SU	医恋性
Į	DR901	SEQ ID NO: 79	WLP	DXI
2	OH104	SEQ ED NO: 90	WPR	DR2
3	DRB46	5EQ ID NO: 123	YSTS	DR3, 21, 13, 14
4	DRB48	SEQ ID NO: 175	V-H	DR4
3	DRJ3207	5EQ ID NO; 283	C-YX	DR7
6	CH 102	5EQ 10 NO: 89	YSTO	DR8, 12, 1404
7	DRB209	\$2KQ ID NO: 285	K-D-F	DRY
8	DIURZO	SEQ ID NO: 91	EV	DR10
9	DRBIOL	SEQ ID NO: 178	E	DRM
10	DRB112-	SEQ ID NO: 188	A-H	1401, 1404
3 [	DRROT	SEQ ID NO: 84	F-DB	1103
Ġ	DRB#2	SEQ ID NO: 119	THLGRP	2

### DR81増幅のためのプローフパネル

	MO-X	Sea. IO No.	AARRI	<b>医药性</b>
12	DRB233	5EQ (D) NO: 299	3	•
13	DRB37	SEQ ID NO: 114	F-DR	•
14	DRBAU3	SEQ ID NO: 279	R	
15	DRB161	\$20 DO NO: 239	K	0401, 0409
16	DEBIL	SEQ ID NO: 194	R-EAR-E	A
17	DREED	SEQ ID NO: 61	1-DE	•
18	(PRH31	SWQ ID NO: 115	K-GR	raci
19	DRB232	SEQ TO NO; 298	Υ	0301
2.0	DRB232	SEQ ID NO: 308	1-DK	13/3
21	DRB135	SEQ 10 NO; 212	t-DR	0903, 1201 (not DR7)
22	DRB198	SEQ 30 NO: 274	V-9	DR7, 0803, 1201
C	DRB42	SEQ ID NO: 119	TXLGRP	· 2

\*限別は多数の異なる対立漢伝子上に認められる (DRB1アミノ戦アラインメント整義)。

0R8 ブローブ 1 ~8 はほぼアミノ酸 9~13の 領域に特異的であり、ブローブ 9 はアミノ爾58に特異的であり、ブローブ10はアミノ酸57~80に特異的であり、ブローブ11はアミノ酸67~80に特異的である。9R81ブローブ13~18, 20, および21はアミノ酸67~74に特異的であり、ブローブ12はアミノ酸67に特異的であり、ブロ

~ブは20アミノ数28に特異的であり、プロ~ブ22はアミノ数67~60に特異的であ ・ る。対象プロ~ブはアミノ難61~68に特異的である。

上紀パネルに示したブローフは複雑して、例7に記載の 089イビング方法に 使用できることに留意すべきである。同じハイブリダイゼーションおよび洗浄条件が使用される。

キットは2つの箱にパッケージされた。一つの箱には DRS試案を、他の緒には DRSI M業を充実した。 毎箱にパッケージされたものは、 DRS以たはDRSI PCRミックス、 GRAコントロール、およびタイピングストリップ:8 mA機能をマグネシウム治液: 鉱油:SA-HRP接合体: 角色原 (PAB) : 反応管: ならびに指示書であった。PCR は塩化マグネシウムおよび縛型のA を除くMR に必要な拡張を含有する。 記載の方法の実践に必要な他の試験および装置はキットユーザーによって供給され、すべた一般に市販されていた。

PCR 増橋に使用するのに達したサンプに刺製操作はいくつか、本技術分野において無知である。好ましい操作は、Singer-Sanの: Anolification 3:11, 1988, および Yalshの: BioTechniques 10(4): 606-613, 1991 に記載された (商記載とも参考として本明報報に導入する) Chelex 抽出法である。生物学的サンプルから状態を提出する他の技術の例には、Sackfrook分: Molecular Ctoning: A Laboratory Manual (May York Cold Spring Marbor Laboratory, 1983): Arradi?Preparation of Mucieic Acids Probes, pp 18-30, in Mucieic Acid Hybridization: A Practical Approach (Maras & Hisgins IRL Press, 1986): または PCR in Protocols, 18-20単(innis今編 Acodemic Press, 1980) の影響がある。すべて参考として本明総書に導入する。

すべての 088配列を増模するためおよび0281配列を特異的に増模するためのプライマー対は、2つの別域の 202反応に使用される。増模反応は Salkiら:2roc. Natl, Aced. Sci. USA 88:6230-6234, 1983 の記憶 (参考として本明結論に導入する)にほぼ従い、以下のように改良して行う。.

反応は経容量(00μ)中サンブル25点(を用いて実施する。多反応は、50 mM KCI、10mM Tris-HCI(pH 8.4). I, 5mM MsCl<sub>2</sub> 10μg のゼラチン、各 200μMの dATP, dCTP, dGTPおよびdTTP, 0.2μMの各ピオチン化増幅プライマー、ならびに Thermus equatious DHA ポリメラーゼ(PECI)を含有させる。

で、旋回旋爆像上約50rpm で5分間インキュペートし、ウエルを再び吸引する。

ストリップを含む各ウエルに、3miの洗浄/酵素接合溶液(3,3miの洗浄液と、使用の15分以内に摂較した酵素接合体27miの溶液から)を加える。トレーを露退で、庭園摂識権上約50rpm で20分間インキュベートする。各ウエルから溶液を吸引し、ストリップを10mlの洗浄液中、電温、旋園摂識権上約50rpm で5分間洗浄する。最後に、洗浄液を各ウエルから吸引し、ついてストリップを発色工程に移す。

発色工程は ORBおよびORB1の両者について同じである。各ウエルに10m1のクエン散経前減 (100mMクエン酸ナトリウム.of B. 0) を加え、トレーを約60mpa の規 色質量機上に進く。好ましくは発色消費はこの間に頻繁する(使用前10分以内)。各ウエルの発色療法は、10m1のクエン酸鍼衝液、10m1のの名名連酸化水素、および0.5m1 [TMB] 意味が対象(PEC) から市販されている)を穏やかに(場で起ごさない)場合する。トレーを放回規量機からはずし、クエン酸鞣高液を収息し、新たに作成した角色溶液10m1を各ウエルに放える。トレーは、角色工程の始めから、アルミホイルのカバーを用いて変光する。ストリップは、素温、数回磁量機上約50ma で30分まで発色させる。所置のシグナル強度が博られたならば直ちに、発色工程は終料させることができる。

所述のシグナル強度が達成されたならば、トレーを設即領導権からはすし、各 ウエルの内容を吸引する。各ウエル内を10x1の脱イオン水で洗浄して発色を停止 させる。水を加え、トレーを監視、約50rpm の旋間頻準横上で5分階級達し、各 ウエルの内容を徐々に注ぎ出す。少なくとも3面洗浄しなければならない。

ストリップは、タイピングトレー中に選光して、2で~8でで2~3日隣保存できる。ストリップは最初時に永久保存用に撮影する。ストリップは、わずかに揺倒はするが、乾燥して相所に保存することもできる。絶景は、DNA プロープストリップ上の責色のドットのパターンを読取り展記する。それぞれの青色ドットは、ピオデン化増幅生産物が固定化プロープとハイブリダイズしたことを意味する。すべての DR3対立達成学を検出する内部対象プロープ(DR842) は、ストリップ上の他の爆性ドットの後度と同等もしくはそれより弱い後度のドットを産生するように設計する。これは、個性と評価すべき最低のドット強度を指示する。

上記キットのプローフは、31のOR61タイプを推測する。これらのプローブで定

両堆幅反称には関一の速度プロフィルを使用し、両反応を同じサーモサイクラー中で開時に行うことが可能にする。サーモサイクラーは、以下の導度プロフィル、すなわち85℃で30秒間変性、80℃で30秒間アニーリング、72℃で80秒間延長の35サイクルにプログラムする。サーモサイクラーは、最後のサイクルに続いて72℃できらに7分間サンブルをインキュベートするようにプログラムする。

PCR からの増幅のA は二重量で、オリゴヌクレオチドプローフとハイブリタイズするように変性されなければならない。増幅のA はサーモサイクラー中96でで6~10分間変性レ、その温度に使用時まで保持する。別法として、変性した増幅のA 老95℃の温度から信頼水浴中に移すことができる。危速な冷却は、DA を変性型で安定化する。増幅DRA は、ハイブリダイゼーションが行われるまで、氷浴中に保持する。

2位のナイロン購入トリップのそれぞれに12個のプロープを付着させる。一方のストリップは DRB増幅複数とのハイブリダイゼーションに使用されるプローブを含有し、他のストリップはDRB1特異的増幅運動とのハイブリダイゼーションに使用されるプローブを含有する。ハイブリダイゼーション反応は、それぞれのプロープ含複ストリップを別名のウエル中に保持するトレー中で行われる。ハイブリダイゼーショントレーはPECIから市際されている。通常、キットで供給される。以下に配轄するハイブリダイゼーション条件は DRBハイブリダイゼーションに特異的である。DRB1 DRAハイブリダイゼーションプロトコールは DRBプロトコールとは、DRB1ハイブリダイゼーションプロトコールは DRBプロトコールとは、DRB1ハイブリダイゼーションが50℃ではなく65℃で行われる点で異なる。プロトコールの他の点はすべて同一である。

ストリップを含む各ウエルは、予め加速したハイブリダイゼーション溶液 (4×SSPEおよび 0.5%養養/容量 SDS) 3 xi、ついで25 μl の増報のNA を加える。トレーの内容を注意深く混合下後、トレーを60℃の増進水浴中に入れ50℃、約約 ron で20分間インキュペートする。

ストリップは最初、緊縮条件下の洗浄の前に洗浄液(1,0×SSPEおよび 0,1%重量/容量 80S) 10 ml 中、意識で散砂酸洗浄し、各ウエルを吸引する。緊縮洗浄の選集および時間にはとくに制度はない。予め加速した洗浄液(10 ml) を各ウエルに加え、トレーを、60℃の整量水浴中約50rpm で 12(±2)分間インキュベートする。各ウエルを吸引したのち、各ウエルに10mlの洗浄液を加え、トレーを整遇

機されるダイブの一部が関連対立遺伝子のセットである。図10には、1990対立遺伝子セットのブローブハイブリダイゼーションパターンを示す。図11,12,および13には、各プローブハイブリダイゼーションパターンの可能な特定を提示する。ストリップの結果は、図11~13を遺扱用いて容易に判定できる。

相楽の閣僚な判定操作はまた、プロープハイブリダイゼーションパターンを入力すると、すでに入力されている概知の対立遺伝学のパターンと合致させて、可能な利定を提供するコンピュータープログラムによって行うこともできる。プロープハイブリダイゼーションパターンを容能性のある対立遺伝学の組み合わせと合致させるのに審脳なアルゴリスムには、単純なデーブルルックアップおよび判定トリーアルゴリスムが包含される。プログラム入力は手操作によっても、また青色のハイブリダイセーションドットの強度を検出する自動ストリップリーダーによってもよい。

上述のように、この遠ドットブロットタイピングによっても、可能なすべてのタイプを完全に関係はできない。たとえば、このシステムは 002血液型の細分類はできない。ある種のヘチロ接合体の組み合わせも完全には分割できない。これらはすべて、以下の例12に数明するように、対立遺伝子特異的場構およびプロープのための別のプライヤー対によって解決できる。

プライマーCXX28 およびCXX28 のハイブリダイゼーション位置のため、このプライマー対で増偏した場合、位置88に存在するアミノ破変異は件ずつできない。 したがって、位置88のみが異なる対立遺伝子は難別できない。位置88におけるグリシンおよびパリンのみが異なる対立遺伝子は7対が知られている。これらの対立遺伝子を以下に掲げる。

#### 位置86のみが異なる対立遺伝子対

DRB1\*1501 and DRB1\*1502 DRB1\*9502 and DRB1\*1502 DRB1\*9603 and DRB1\*9603 DRB1\*9603 and DRB1\*9603 DRB1\*1101 and DRB1\*1104 DRB1\*1301 and DRB1\*1302 DRB1\*1301 and DRB1\*1302

## £110

## 一般DR81タイピング戦略工

例4には、0881対立機伝子のタイピングの動略を記載した。ここには、別の機能を記載する。0881減伝子原におけるすべての45十対立遺伝子の完全体識別を激成するためには、2段階核定が使用される。第一段階は、会サンブルの 088一般プライマー、GM6および6HBDによる地域である。得られた YER室物を固定化し、どの対立遺伝子体験的性解を実施する必要があるかおよび第二の段階でスクリーンすべき増維整物を決定するために、第一パネルのプローブで探載する (例4と)の限にして)。増幅およびハイブリダイセーションプロトコールは例4とほぼ配一である。対立遺伝子特異性を参照したハイブリダイセーションパターンの判定は、各プローブパネルについて掲げる。

### 第一段期タイピング

プロープの第一のパネルは、嵌ょに示したプロープパネルと、2、3のプロープが異なるだけで、無限している。以下のプロープパネルに示す対立遺伝子特異性中、対立遺伝子記号の最後の文学としてのXは、特定された委号で始まるすべての対立遺伝子が提供されることを指示する。たとえば、030Xは、0301,0302 および0303と同一である。

### 第二段階タイピング

082

マイプが血液学的に 082である、¥-P-R(84104)に対する機性シグナルを含すさサンブルは ¥-P-Rにビトープを持ずる対立遺伝子に特異的なプライマー対、888のよびA880で増催される。待られた生成物は以下のパネルで探索される。

HLA 0A2 タイピング SSOプローブ										
70-7	SEC ID NO:	エピトーフ	对立河安于	MAN (SSPE.JC).						
(Special)	SEQ ID NO: 140	"ኦለ"	15000	0.1%, 42						
DK8113	SBQ ID NO: 149	~D#*	1002	0.1X, 42 or 0.4X, 30						
CRXM	58Q ID NO: 7)	"F.DR"	1601	0.2X, 41						
CRX57	\$50 ID NO. 78		1501, 1502	0.2X.42						
CRX56	SEQ ID NO; 77	~U~	102, [60X	0.7X, 42						
DR9196	55Q ID NO: 272	HET (30)	1503	LOX. 43						
DRB197	SEQ (IN NO) 273	**Y**(30)	1501, 1502, 160X	LOX, 41						
GROW	SEQ 10 NO: 90		PRZ	0.2X, 41						
CRXII	2EQ D3 NO; 63	DRB ' 盆'	2	0.2X, 41						

示されたプローブは、ハイブリダイズし、ついで42でで15分関洗浄する。SSPE 溶液はすべて 0,1%SIS を含有する。各プローブは、67末継で HRPに接合させる。 <u>083,086,0866</u>

プロープのBUでエピトージYSTSに対する領性シグナルを含有するサンプルは、 DR3, DR5, またはDR8のよりれかである。これらの対立遺伝子は、ABR2およびABSD で特質的に機構される。これらの対立遺伝子は、以下のプローブパネルを用いて 強制できる。

#### HLA DRO タイピング SSOプロープの第一のパネル

	100000		T. F. T. Branchin	
70-7	SERMINO:	エピトニズ	超立遺伝子	<u> 美漢 (SSPE, YC)</u>
CRX33	इक्ष्म् का लाह स्व	W.T-L	01030	0,4X, 42
CHILDS	STEQ ED NO: 90	"X7W"	150X, 160X	0.2X, 42
GHIS	50Q (D) NO: 86	"YSTS"	030X, 110X,	0.2X, 42
			130%, 1401, 1402	
OK10	SEQ D) NO: 87	"V-45"	040%	0.2X, 42, 20
CRX49	SEQ ID NO: 74	"CIYK"	070X	1.0X, 42
GH102	SEQ ID NO: 89	"YSTG"	030X, 130X, 1404	D.135, 42
CKILL	SEQ 10 NO: 92	"K-+ÐF"	0901	0.4X, 42
CRX34	SEQ ID NO: 10	"EV"	1001	0.4X, 42
OH122	AND ID NO: 93	-£v	110X	0.2 K. 42
C92X61	SEQ ID NO: NO	"5"	0405, 0409, 0410,	0.1X, 42
			0411, 0801, 0803	
			1304, 1305	
CRX(23	SEC) 10 NO: 66	"A~H"	1401, 1404	0.1X, 4Z
CRX06	SEQ TO NO: 63	7-DP*	0103, 0407, 1107,	0.1%, 42
			1301, 1302, 1304	
CRX35	SEQ 10 NO: 71	T-DR"	1601, 1101, 1104,	0.2X, 42
		•	1305, 0801, 0802,	
		·	0804, 1202	•
CAXG	SEQ ID NO: 84	T-DE"	1103	0.2X, 42
CRX62	8EQ ID NO: 81	"I-DX"	1303	0.2X, 42
CRX12	3EQ 10 NO: 63	Dru. \$ "	<del>오</del>	0.2%, 42

プロープをハイブリダイスレ、ついで、42℃で20分間洗浄する6時9を除き、42℃で216分間洗浄する。55℃治療はすべて 0.1%505 を含有する。各プローブは、61末端で 160℃接合させる。第一のプローブパネルから繰られたハイブリダイゼーションパターンに基づいて、サブタイピングこうていには対立遺伝子特異の地質が必要になる。

DR7,000,およびDR10の各タイプは固定できる唯一の対立遺伝子しかなく、第一段階のプロープパネルから直接固定できる。実際、DR7 タイプを特定する対立連伝子には、DR8140701 およびDR0140702 がある。しかしながら、これらの2つの対立遺伝子は第三のエクソンのみで異なり、第二のエクソンからの配列を準備および検出する本方法では開閉できない。したがって、本発明の方法では唯一の明確な対立遺伝子が固定できる。

### HLA 083.5 MGタイピング SSCプローブ

70-7	SECIONO: I	ピトーブ	对立流衍子	PAR (SSPE. C)
CRXXX	SEC 10 NO. 75	KON	030K	0.2X, 50
GH125	SEQ TO NO: P4	Y	0301	0.4%, 50
D748180	SKQ to NO: 256	A .	030X. 1301, 1302,	
			1305, 1402, 1401,	
			1401	
OH( 22	\$60 ID NO: 93	E	3931	0,231,42
CRN6s	OB STON OIL DOGS	\$	1303, 1304	0.2 K, 42
CRXC23	SEQ ID NO: 54	AH	1401	0.1X, 42
CRX06	\$20 ID NO; 61	1.08	1102, 1301-02	0.2×. 42
CRX62	\$6Q ID NO: \$1	I-DK.	1303	0.2X, 4Z
CRX68	580 ID NO: \$4	FDE	1103	0.2X, 42
CRXIS	SEQ 10 NO: 11	FDX	110), 1104, 1305	0.1X, 42
CRX04	SEQ ID ND: 66	x	1402	0.1X. 42
CRX57	SEQ 10 NO: 78	v	0301, 0303, 1102,	0.2X, 43
			1104, 1301, 1304,	
			1305, 1405	
CRXSA	\$5Q to NO; 17	G	0302, 1101,	0.230, 42
			1302, 1303, 1305,	
			1407, 1403	
OHUS	STIQ ID NO. 86	X21.2	DRS, DRT, DRM	0.2X, 42
CRXII	55 20K Q1 Q32	DREET SE'T	2:	0.2 K. 12

示されたプローフは、ハイブリタイズし、プロで420215分間派券する。896 療験はすべて 6.1%505 を含有する。各プローフは、57来週で 個Pに集合させる。 MA4

プローブのMSBでWHエビトープに対する属性シグナルを含有するサンブルは CRMである。これらの対立遺伝子は、ABG4およびABGがご特異SMに増稿される。これらの対立遺伝子は、心下のブローブパネルを用いて執知できる。

70-7	エピトーブ	对立进位还	洗液
CRX61	5	0405, 0409, 0410, 0411	0.3X, 42
CRX64	ĸ	0401, 0409	2X, 40
CRX04	R	0403, 0404, 0405, 0406,	0.1X, 42
		0407, 0408, 0410, 0411	
CRXLS	R-E	6403, 6406, 6407, 6411	0.4X, 55
CRXOS	D)E	0402	
CRX37	٧	0402, 0403, 0404, 0405,	0.2X, 42
		0410, 0411	
CRXS	a	0401, 0405, 0407, 0405,	0.2X, 42
		0409	
OHS9	V-H	DR4	0.2X, 42
CRX12	DRB" 🏖 . "	<b>2</b>	0.2X, 42

糸されたブローフは、ハイフリダイズし、ついで42でで15分間洗浄する。ただし、6/150の場合は例外で、42でで20分間洗浄する。SSPE洗浄浄液はすべて 0.1% SOS を含有する。各プローブは、5′末端で HRPに接合させる。

#### 0R1, 0Rv8, #3-EC/ 0RW12

プロープCRX33 でNF エピトープに対する機性シグナルまたはプロープSH102でYSTGエピトープに対する機性シグナルを含有するサンプルは DR31 特異的プライマーGH4GおよびCRX37 で増稿される。これは、DR2, DR7, およびDR9 を除きすべてのDR81対立運伝子も増稿する。対立運伝子は、ついて、以下に示すプロープバネルを用して増別できる。

ブハイブリダイセーションパターンは、サンブル中にどの対立適位学エピトーブ が存在するかは指示するが、存在する特異的対立適位学を決定するには、どのエ ピトーブがどの対立適位学に存在するかを知る必要がある。 通常、エピトーブ起 源は、対立適位学の組み合わせの可能性に限定があるので、推測可能で、このような不明瞭はほとんど起こらない。 起こることがある者な場合は対立適位学特員 的増幅を用いて解決される。

DRS/OR68へテロ接合体では、以下のプローブパターンが起こり得る。 ・プローブ GAS4 + GREEZ + DRSES0 + CRXS4 + CRXS5 + CR

3つの異なるOR5/OR68へデロ接合対立遺伝子の組み合わせが、このブローブハイブリダイゼーションパターンを生じる。これらの組み合わせを以下に掲げる。これらのヘテロ接合対立遺伝子の組み合わせは他のブローブでは関別できない。

DRB1\*1101 および DRB1\*1301 DRB1\*1104 および DRB1\*1302 DRB1\*1102 および DRB1\*1303

これらの可能性を推別するためには、位置88における独特の二形性を利用する他のプライマーが設計された。DRB1対立遺伝学はすべて、位置88にパリンまたはグリシンを含有する。上に接げた多へテロ接合体では、一方の対立遺伝子は位置86にパリンを、他がはグリシンを含有する。QRB1×1305, QRB1×1104, および QRB1×1102はそれぞれ位置86にパリンを、QRB1×1101, QRB1×1302, および QRB1×1305はそれぞれの重88にパリンを、QRB1×1101, QRB1×1302 および QRB1×1305はそれぞれのリシンを含有する。VまたはGP4異のプライマーを影特異のプライマー(N-PR, VI, またはYSTS) と組み合わせて用いた増幅では、位置80における多形に基づいた単一対立遺伝子の増幅が可能になる。この方法で、多へデロ接合となるでする2つの対立遺伝子のは一位ですることが可能で、直接プロープハイブリダイゼーションによって決定できる。第二の対立遺伝子は、可能な対立遠伝子の能み合わせに基づく第一の対立遺伝子の知識から推定できる。

単一対立遺伝子増和による985/0866ヘデロ接合体のサブタイピングは、PCRプライマー対A882/RAP05およびA882/RAP08を用いて達成された。増幅は、PCR 級別 液に最終深度1.0mM MsC1<sub>2</sub> を添加したほかは例10と同様に発施した。サーモサイクラーは35サイクルにプログラムした。温度プロフィルは、94℃にランプ、94

		14 24   0	OUGUED (
		对立进位于	洗按 (\$\$PE, 10
	WLP	010X	G.4X, 4Z
CRX04	R.	0101, 0102, 0403, 0404,	0.1X, 42
		0405, 0405, 0407, 0405,	
		0419, 0411	
CRX06	TOE	0103, 1102, 1301, 1302	0.2X, 42
CRXST	V	0301, 0402, 0403, 0404,	0.2X, 42
•		0408, 0410, 0411, 1102,	• "
		1103, 1104, 1301, 1304,	
		1401, 1404, 1403, 0804	
DRBISE	AY	0102, 1201, 1202	0.1X, 42
CRXX5	G	0101, 0103, 0302, 0401,	0.2X. 42
		0405, 0407, 0408, 0409,	
		1101, 1302, 1303, 0801,	
		0102, 0103, 1105, 1402,	
		1403	
QHI02	YSTG	0801, 0802, 0803, 0804,	0.1X, 4Z
		1201, 1202, 1404	
GH34	V-\$	1201, 1202	0.4X, 42
CRX63	I-DR	1201, 0403	0.2X, 42
CRX35	F-DR	0601, 0802, 1202, 1101,	0.2X, 42
		1104, 1305	******
CRX12	DRB" S "	<b>4</b>	0.2X, 42
	CRX69 CRX06 CRX06 CRX37  DRB181 CRX55  OH102 GH34 CRX63 CRX35	CRX04 R  CRX35 DE  CRX37 V  DRB181 AV  CRX35 G  GH102 YSTG  GH34 V-S  CRX35 LDR  CRX35 F-DR	大田   大田   大田   大田   大田   大田   大田   大

示されたブロ〜フは、ハイフリダイズレ、ついて42℃で15分間洗浄する。88年 洗浄浄液はすべて 0.1%808 を含有する。各プローブは、61末端で 州がに接合さ せる。

プローブによって露糞されるエピトーブの一郎は多くの対立遺伝子によって共存されるので(たとえばPDR)、上記プローブパネルとのハイブリダイゼーションパターンから得られる結果は、プローブがBRT。DRRA もしくはDRR1で具体のプライマーで同様に単幅を100円の対立遺伝子が調査するか、またはORB1で共存のプライマーで同様に単幅を10円の対立遺伝子が調査するからために、保かの対立遺伝子特異的関係と比較される。MLF および78 TGエピトーブはタイピングの結果の判定を単純化する。

#### £211.

#### ヘテロ接合体の対立遺伝子サブタイピング

例10のプローブパネルとのハイブリダイゼーションパターン単独では、ある機のヘテロ接合質体に存在する対立違伝子の明確な決定には不十分である。プロー

でで30秒間変性、30秒間アニーリング、および70でで延長とした。プローブハイプリタイセーションは前述の進り行った。V-特異的(RAPOS) およびG-特異的(RAPOS) プライマーは以下に、また配列掲載的に示す。それぞれASS2と組み合わせて使用したが、他の戦待異的プライマーも連載である。

<u> </u>	EO ID NO:	<b>拉男</b> 拉·	<u>见</u> 测。
RAPUS S	EQ ID NO: 312	O (86)	5'-COCTOCACTGTGAAGCTCTCACCA
RAP06 53	£12 :ON Œ DB	V (86)	5'-COCTOCACTOTGAAGCTCTCCACA

#### 倒12

### CR8 2 段階タイピングキット

ここに記載されるキットは、奇能な限り多数のタイプを独特に同定するために 設計されたものである。プライマーおよびプローブは、逆ドットプロットフォーマットにおいて、8681および0983家伝子座の迅速な、しかしながら完全なタイピングを提供するために設計される。0981途広子座における全46十対立連位子およびDR93週伝子使の3個の対立通位子の完全な課例を選成するために、2 数据検定を使用する。第一段階は、全サンプルの DR8一般プライマー、58827(SEO 16 MO: 1051およびDR328(SEO 18 MO:108)による増幅である。得られた PCR座物を13プロープのストリップに対してスグリーニングし、これで対立遺伝子特殊的増幅、あよび第二級階のスクリーニングが必要が否が扩決をされる。

域様およびハイブリダイゼーションは例9と関係に行う。 DR3〜般的域権から の増植酸物は、DR91減伝子座の第一切変領域に特異的な8つのプローブ、3つの DR83進伝子座(62x,52x,52x,52x) に特異的な4つのプローブ、および1つのコントロ ールプローブを含有するプローブパネルに対してスクリーニングする。3つの対 立連伝子を有し、DR2ハロタイプに見出される9RB5速伝子磁をタイピングするた め、このストリップにさらにもう1つのプローブを付加することもできる。政策 される特異的ハイブリダイゼーション領域およびタイプを以下に掲げる。

	製造されるタイプ	探索配列 .
1	DRI	WLF
2	DR2	WPX
3	DRJ, 5, 6	· YSTS
4	DRA	VH
5	D9.7	OYK
6	DR8, 12	YSTO
7	D89	KOF
8	DRIO	ēΥ
9	524	LRS
10	325, 32c	LLS
11	32b	段胜中。
12	570	投計中
13	*	TELGER

DBSタイプはこの検定の結果から決定され、この検定の結果に基づいて、どちらの対立適屈子特異的環境(ASA)を行う必要があるかを決定する。サンプルのタイピングに最も必要なものは2つであるが、6つの異なるASAを提供する。同じ3・プライマー、ASOはたとえば、すべての5つのASAに代えて使用でき、通常、キット中に加えられる成分に包含される。5・プライマーによって、規模特異性が付きされる。名5・プライマーによって、規模特異性が付きされる。名5・プライマーによって規模される「ASOタイプおよび保険されるエピトープを以下に掲げる。プライマー2、3および4が放射され、広範囲に試験され、上紀実施例で設明した。

	ハイブリダイゼーション観列
AD THE COLUMN TO	

DRI	WLF
DR1	wpr
DR3. 5. 6	YSYS
DR4	YH
DR8, 12	DY2Y

第二枚的は、ASA からの増昭な物の5つのタイピングを可能にする一連のプロープに繋する。一実施根板においては、すべてのプローブを単一のストリップに付着させ、この単一のストリップを ASAからの生成物のタイピングに使用する。以下の頻繁に待異的なプローブが ASAの結果のタイピングに十分である。

THE CON CITE AND GRAY OF THE WAY ONE CON CITY CAN.

THE THE THE CON CITY ONE WERE CON CON CITY CAN CON THE CON THE THE THE THE THE CON CITY CAN CON CITY AND CON CITY CAN CON CITY CAN CITY CAN

CHAINTION (FEU IN ME) 1911: CA COY THE TRY CARA THE TOY AND GOT GAN YOU CAT THE THE AAT GOD AND GAN FOR STATE GOT THE CITE AND AND AND THE TAT MAC CAN GAN HAS THE GIVE COD THE GANT AND HALL GOT GOO THE THE COD CITE AND GAN GAT GOD COD CITY FAT GAN GAN THE THE THE AND AND AND CARA AND THE COD CITY GOT WAS AND AND THE WOR AND COT GOT ONLY AND THE CANA AND THE COD CITY GOT WAS AND THE WOR AND CANA CYCL FOR

ONDI-1201 (SEQ TO NOT: 33).

A UST TIC TYS AND (SEQ ACC) GAS CSG GYN CSG TYN CYG GAN ANA CAC TYC TAC GAT GAS AND CAC TYN CYG GAN ANA CAC TYC CAC AND CAC GYN CSG GYN C

DABLE-1304 (AND 10 MH: 15); CA COT TTO TTU DAD TAN TOT AND TOT ONE TOT ONE THE TTO AND GO AND COD ONE DOD THE DEB TTO CAS AND AND THE TAY AND CAN GUE SAN THE OTH COLI TOT ONE THE DEB THE COT ONE GUE THE TTO REA OTH COT AND ONE OTH THE COT AND COC OR AND THE TOU AND AND CAN AND CAC ANT COT WAS ONE ONE COT COC ONE OTH ONE COC TAC TOO AND CAN AND THE COLI OTH THE COLD ONE THE AND THE CAS OF THE TOT ONE AND THE <u>エピトープ</u>

9世 エピトー丁 57-60 DAE, S. E. A-H, V-S 67-74 R. I-DE, I-A. F-DR, DR, KO2, K, R-B/RR-E, F-DR, I-DK, I-DR, DR-I-

85-86 G. V. AV

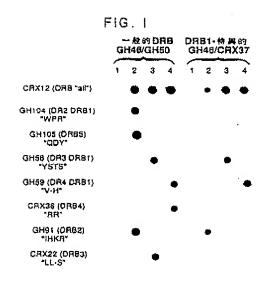
を分的 E (a.s. 20), H (a.a. 30), Y (a.a. 26), S (a.s. 37)

「その他」の領域の多形は白人の間では優めて希だある。しかしながら、本現明の重要な目的は非白人集団のタイピングも可能にすることである。これらの位置における他のプロープを、ヘテロ接合体対水モ接合体の環境における不明瞭性の解決のために、包含させることもできる。

#### 表9

#### 1989対立遺伝子セットに含まれない対立運伝子

### 特表平6-505625 (21)



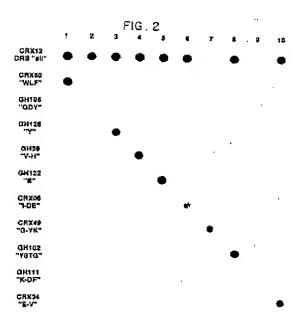
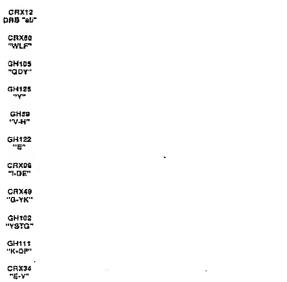
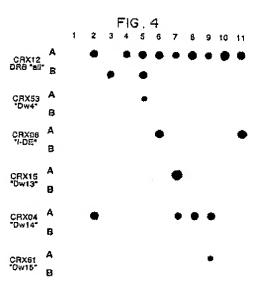


FIG. 3 8 8 7 8 9 10

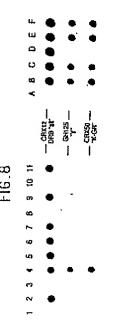




		1	\$	3	4	s	ę	7	8	9	10	11			
CRX12 ORB "ali	. B		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•			
CAX35 'F-DA'	A 6			•			•	•							
CRX57	H A			•	•					•					
CRX06	A B			•						•		•			
CRX61	•		•			•	•								
CRX82	<b>А</b> В		•												
GH159	A				•								Fle	G.8	5
CAX62 1-DR*	A B					•			•						
CAX50 'K-GA'	, ,				•	•							,		
CHX56	A 8			•	•	•	•			•	•	•			
CAX04	A 8		•									ı		,	
CRX23	^									•	•				

										-	•	•		·		u
HIG-OUR	loro.		1191	120	1343/401	20€	1303	3	AGA, NOTONO	i i	2000	600				
95		Ī	Ī	1			Ī		Ī	T	Ī					
200		T	Ī	T	Ī		-		ľ	Ī	-		1			
95				Ī			•	Ī	Ī	•		-				
<b>∄</b> ⊁		Ī										Ī				٠.
ŝ;	Ī.		Ī		•						-					
STED STATE			•		•	•	•	•	•		•			g	,	
E S		ľ	Ī		•									FIG. 6		
A DE		,			٠	•			•							
8 1 1 1 1 1				,				_		,	+					
8 8 8 8 8 8		•					٦									
<u> </u>	٠															
<b>学校第</b>	j	15.	SPODIO	HERLINE	XQE	,	3	YWY	E E	¥	1 735	171				

	•			•							•			
w	•			•							•			
a	•			•		•		•						
ü	•	•		٠										•
20	•			•										
~	-													
	OFIS WE	CRX 60—	- SODY -	- GHS6 -	- CH53	GH122	CRX06	— CBX49 —	CHIRZ	- GH111	— CRX34 — *E-¥*	- CRXZ3 -	CRX3S T-DR	- CRX04
Ξ											•			
2	•							_		•				
en .	•								•				•	
œ	•							•						
~	•			•			•							
9	•			•		•							•	
v	•				•									
*	•			•										
n	•		•										•	
64	•													•
_														
, ,														
7 513	<u>.</u>									-				



特表平6-50562**5 (23)** 

<u></u>	-	<del>,</del>	-	•		,		-	-				_
	5030/1010	07017301	OSO1/1001	1020/1020	DEPT2/1101	B9415/0301	DNO!CDBN13	1060/10/0	10/0/10/0	0101/11010	D10170701	DEN15/0701	
S Crowner			٠										
GHIII CONGI								٠					
2018 Nr-9 P-7 30-1			٠									ļ	1
55.79 57.79		٠		ŀ				٠	-			+	
SI.													
9023		-											8
9 GH122 G					•		•			٠			F16
37	٠						+			Г			
27.75 52.99 52.99								g	2	盟	2	2	
<b>SE</b>						٠		Ŷ	æ	2	2	9	ĺ
3					٠	٠						•	
87	•									٠	+	-	
•	555	283	634	766	342	500	288	2426	2416	5540	7671	2755	

ORB	, ,	1	<b>,</b>	19	_	5					71	- German	10										
											7	<b>5</b> ~	. 7										
44	ŧ.					Т					317			77	11		-	1			T	1	-
0101 8100		¥	-	4	Τ.	Ŧ	П.	7	I			1::		-	~~	+	7	4.	-	4.5	4-	- 2	2
0103	14	3-	+-	<del>-</del> -			-			-	-		$\mathbf{T}$		3					1		+	-
1541	£	- 3	i	╆	٠.	-		-	+			<del></del>	┿	-	-1-	+	_ 8		-	T	-	Τ.	_
1691					3		1	-	1	-	+	-	+	+		4	-		-	+-			
1607		-		4	7	7.	7	7	I	_		1	1	_		-		-	┿~	+-	+-	+	-
190	-		<del>!</del>	+	+-			┿-	+			-	Τ.	1		1			$\boldsymbol{\bot}$	7		1	_
1033				1	1	_		<del>-</del>	+	+		<del>-}</del>	- <del> </del>		·	4-	<u>-</u>	+-		- į	-	4	_
6301	_	1	扭	1	1				1		+-	+-	+-		+	+-		-	94	<u></u>	4-	+	
8401	-	-	-	•	_	-	4		-				1		_	1	-	14		-	<del> </del>	+-	-
BART	$\leftarrow$		+	100	7-	┉		<del></del>	-	-		-				1			7	1		1.	•
0402					¥.::	-		+	+-	~+~	-		<del></del>	+	┿			-	-	1	1		_
9434	L.	-		Ж	$\mathbf{I}$	7	$\top$			$\perp$	1	-	ት	20	٠-	-	7-	┪—	+-	ļ		+	*
0408	-	┼	-	ж	3-	+-	-	-	Τ.		$\perp$			- 3				1	j	+-	₹-	+	
6407	-	1	_	協	ą		+-	┿	-}	سۇ		<del>-</del>	+-	-	-	- 4		_	二	1		Τ	•
0408		$T_{-}$		18	и—	1	1	_	Ť.	٠	+	+	┿	100	···	ΞΨ,	4-	ببط	<del>! -</del>	₩	-	١	
P408	J	٠	-			_		Щ	1		1		1		172	ď-	┪~	+	+	╄	+	┿╼	-
3411	-	+-		E	ş	<del>-</del>		+~	+	4.	-	133		. 100	1	$\mathbf{T}$		1		1	_		-
1012		+-		-	٠-	+	┪~	<del>-)-</del> -	. laz		-	, KE	'n	J.,	-	ж	ā	П				L	_
1102		_						1	120	7 -	-	-	~	٠	<del>-</del>	+-	A.	٠.	-	-	-	ļ.,	_
1104	<u></u>	ļ	2.7		-	-	_				30		1	1	1-	1	-	-	_	┥	<del> </del>		_
1201	-	⊢		-	<b>∤</b> -	٠	٠.	+	. 1886		1	-	H			$\mathbf{I}$	7~	1				14	1
1201			_	_	†~-	-	<del>}</del>	╁	+	+-	<del>+</del>	┿	W	↩	٠.	٠	Ι.	-				انبا	á
THOS			di			$\mathbf{I}$	1	1	1.	-	-	-	pa.	٩	−	+	-	****	<del>-</del>	<u> </u>		<b>K</b> OK Á	4
1301	-				-	ļ.,	-	Ι.,	П						-		200	_		-	-	-	1
1204	Η-		3		-	+-	<del>1</del> −	┺	٤.,	4		(Q)				1		_			-	_	1
1308	_	-	W.	_	-	+	+-	┪	ŧ	<del>-</del>	+-	100	'n	<b>.</b>	-	_	Æ				Į	Н	1
1451			Á				<b>†</b>	1	-	in.	•	-	<b>100</b> .5	Η-			⊬	ш	_	_		-	ł
1603	_	<b>-</b>		_	_		1	$\blacksquare$		$\blacksquare$		-	_	7	┢	_	٠	-	-		-		Į
1464		-	44	-	⊢	_	-	Ι	-						Ĭ				_	_		_	ļ
or /			-	-	100		١	<del> </del> _	١	Mi.			_			100							Ì
ones [						-		┪			·	$\vdash$	-			<b>—</b>	<b>-</b>	-		_	_		Ü
D401 D802	_					70			_		***	117	351			-	-	-	<del></del> i			G22	ļ
0001				-1	-		_						279			_	<u> </u>		···· ŧ				N
0401	-				****			-	-	_		238								_	ĠG,		ì
0001 (	_					□."	100	-	-		-	-	450	-	-	_		-1		_	$\neg$		į
1001 [	7	- 1	_	_		•		127		*****					_					£	1	- 1	á

					Flore	<b>= 11</b>					
ナーロナ	2 G H 2 G H 2 G H 3 G H	ol	ORENSOI	ORATIVOS (1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.	Special of the control of the contro	[1] [1] [1] [1] [1] [1] [1] [1] [1] [1]	Delitera	Draity GOOM CALL TO THE TOTAL TO THE TOTAL	O'BHUNCHERS	Order vescour	G001 0400

Figure 13

				*	iquee L	ž				
DMES タイプ・ドケーン プロープ	1.59	Notes have the second of the s	Population Control of the Control of	Orbilities : I a I a I I I I I I I I I I I I I I I	(4) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1	Norther Northern Branch (North Parks)   Northern	Delicibuliza	Politico Control Contr	Desirance Classic Control of the Control of the Control of the Control of Con	anier sus Amprobit Hepropous, 1841 pales (1961 H.)

1061 9 4 7 4 9 - 2   1   1   1   1   1   1   1   1   1	19.65 3 4 7 4 5 9 - ン
CDQ15500c	

	G # 1	L SEC VIL 157 Subrandoni Applicator No.	PCY/US 91/09294
	CATION OF SURVEY MATTER. N SHOP SHOW		
7,000		tent Contractor in G.C.	
[at.Cl.	5 C1201/61		
6,1463,03 C			
			····
-		Charles (45)	
[at.Ct.	P C150		
	Personalis Service to de Espec des tres Servi	el aller fler feltespep Demografishe Paulpe for Happers II der Phops Empirer <sup>2</sup>	
	ENTS OCHERNMENT TO BE RELEVANT!		Suprem in Claim Held
Orders ,	Charles of Property (1 top Substitute above	Abinistic is do teneral interdes .	
k	MOLA, 8 931 547 (CETUS CORP see claim \$	) 10 Koyamber 1989	1,2
4	DMCKGGENETICS vol. 30. September 1989, N	EW YORK US	1.2
i	pages 208 - 213;		
	I. RUGGER ET AL.: Typing HLA-0981*06 uping sliete-1	for MRA-CPB103 and	
	amplification and alielers	ministe our in viers	
	aligonuciantide probes. De	tection of "wew"	
	DP83"06 variants"		
	sea the whole document	-	
. 1	MO, A, 8 904-875 (CETUS COMP	1 1 June 1984	3(4.7)
' 1			3,4,7,
- 1		•	13,24,
i	ses page 44, line 14 - 14n	. 10	28,29
	ate bide se' (lue te isu	. 13	
		1/44	}
- 1			l
'A'	pangorie al titol damandi ( <sup>16</sup> more policies ( ile pomos date al tito es siddà is mi legral is is al parifesso ( ilestica) al françois (es paidales) es ar pius ile international piere	The framework was a series of the series of	
4 - 400	r dere Australia austria deservica de selecto districi di		Spirit of Salating by
- 1112	ment while may draw drawn to printing this or persons to the strict to markets the printing this or persons and or only the markets the printing this or persons and or only the persons the persons to printing the persons and or only the persons the persons to persons the persons and or only the persons the persons to persons the persons and the persons the persons the persons the persons the persons the persons the persons	" hand the bear	re the change broughts
10" 100	CONTRACTOR IS AN ADDRESS OF THE PARTY OF	Propriet de la mantré desp "y" l'exemple de paréclaries métroles después de paréclarie de Service después de la paréclarie de service parècle, code combination la langua la maiorie, de combination la langua la maiorie,	or they said and hear
7 111	der på 8663 i ton depen men Soldere blet in de prodester, light gree pa	"b" description of the com-	participal design
v. chiles			
	areal Companies of the American Perch	Day of Printing it this towns	mustant byen
	87 APRIL 1998	2 5 04 92	
			Em 2 Jem

	Esternoquesi Application File	PCT/US 91/09EP4
	perfective and the perfect of the perfect of the period of	
	Crosse of Decement, with Indicator, where appropriest, of the column prompts	Balance to Oute Ms.
The state of the s	EP, A, O 287 862 (CETUS COSP) 16 September 1987 cited in the application	5,7,10, 11,15, 16,16, 16,18, 16-29
- 1	ses page 43, line 2 - line 6	
- }		
1		
- 1		
- }		1
ļ		
į		
1		
- 1		- 1
l.		1
. !		
ŀ		1
ŀ		
J	the state of the s	ļ
- 1		
- 1		
		1
		1
- 1		
- 1		
		i
		1
		l l
		1
		1
- 1		1
- 1		}
j		j
- 1		i
- 1		
		i
- 1		
- 1		
- 1		1
- 1		1
- 1		1

**国界海雀希告** 

US 91092P4 SA 66499

## this search like the related healty excellent relating as the passed decapated about in the observance(appel beautiful overly report, the markets provided by the Computer France (Table 1929 in one 1929 in one of the Computer France (Table 1929) in the Computer France (Table 1920) in one of property from portaining which was exercing given for the purpose of information. C7/D4/92

Print desired and to mare import	Patitionina Side		Proper broky sember(s)	Publisher East
WO-A-8913567	20-11-00	AU-A- EP-A- J9-7-	3690849 0417160 3504326	tr-12-89 20-03-91 25-09-91
WQ-A-6901875	01~56~89	EP-A-	0439458	07-01-91
EP-A-0237362	16-09-87	AU-B AU-A- 8P-A- 3P-A-	0499632	01-03-90 17-03-87 94-12-91 04-12-91 21-09-87

#### フロントページの続き

- (72)発明者 ブガワン、テオドリカ アメリカ合衆国94579 カリフォルニア州 サン リードンロ、ファリス ストリート 15524
- (72)発明者 グリフィス,ロバート エル. アメリカ合衆国94002 カリフォルニア州 ベルモント,オーク クノール ドライブ 1820
- (72)発明者 シャーフ,スチープン ジェイ. アメリカ合衆国94709 カリフォルニア州 バークレー,フランシスコ ストリート 2028 - 1 / 2
- (72)発明者 アップル,レイモンド ジェイ. アメリカ合衆国94116 カリフォルニア州 サン フランシスコ、トウェンティーセカ ンド アベニュー 2622

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載 {部門区分】第1部門第1区分 [発行日】平成10年(1998)8月18日

[公表番号] 特表平6-505625 [公表日] 平成6年(1984)6月30日 [年通号数] [出願番号] 特願平4-502862 [国際特許分類第6版]

Α

C12Q 1/68

r. r l

C12Q 1/68

#### 手統補止音

т£ 10 # 2 Л 25 3

特許净良會 数

[in

/3----

1. 事件の表示

华成 4 年特許額等 502862 号

2. 検正をする者

事件との関係 特許出版人

名 弥 エツ、ホフマン・ラ ロシニ アーゲー

3. 化 與 人

© #100-6001

東京都千代田区大手町"。丁日2番1号 新大手町ピルデング 331

老 话 (3231)3651 (代数) 近名 (6669) 後 村 第

4. 锚正対象击损名

· 翻 移着 特状の範囲

5. 精光对象项目名

領水の統領

6. 領重の内容 別級の港り

#### 概念念報酬

- 1. サンプル中の痕象のIRG 30型を決定するための方法において、
- ⑥ 388 実位子第二エクソンを含有するサンプル中の任弦の情報を開係し、
- (b) 14位(d) で増模された上部保設を第一のパネルのオリゴタクレオチドブロープと、これらのブローブが10スクレオチド系を結える正確に指摘性の圧例にの
  みハイブリタイズを名ような条件下にハイブリタイズをは、
- (c) 016 適便子第二エクソンの区列を含わるサンブル中の技績の特異的サブセットを指摘し、
- (d) 工程(d) で地類された上部保敬を第二のパネルのオリゴをクレオダドブコープにしたものプロープが10タクレオデド幕を越える正確に指揮性の民族とのみパイプリダイズでもような条件下にハイブリダイズでは、ついで
- (金 上降 の)および(の) におけるプローフハイブリタイゼーションのパターン からサンプル中の原語 ではの曲来する原書が監視法を参議する。 上見がうなる方法
- 2. 工程(は10kt/fe)の増格は、一次のオリゴタクレオデザブイマーを用いてボリステーセ連続度を出まって行い、工作(はにおいて用いられるブライマータメ工程(けにおいて用いられるブライマー対とは異なる「雑水業1」投機の
- カンボース (外において 用いられる ブライマーは 50% ちよじ (今年 であり、下屋 (小において用いられる ブライマーは 60% ちよび (02%) または (33% および (02%)) または (33% および (02%)) または (33% および (02%)) または (33% および (02%)) または (33% および (02%))
- 4、オリゴタクレオチドブローブの端一および第二のパネルはそれぞれを発または名名のたのブローブからなり、これらのブローブはRRB海転子等ニエクソン及列のハイブリダイズル。これらの認めはアモノ製強着9~48、アミノ製発着9~47、ボスルアミノ教育着30をコードする認列からならがより報信者のたコードする認列からならがより報信者の作用では、近畿の方法。
- 5、パウコスクレオテドブレーブの26〜のパネパは、プローブ CRG3 859 10 80: 76), 64(65(56) 10 (86:00), 64(4/85) - 6 (40:89), 64(8)(56) - 6 (6): 87), 53(46) (80) 0 (80:81), 64(22)(56) (前 86:83), 63(23)(50) 10 (80:69), 63(35)(30) 10 (80:

71)、CRXは(950 (0 M).741,68102(SE) 10 M).88)、68111(950 10 H0.92)、CRX34 (SEC H0 M9:X0)、CRX34(950 0 M0:60)、GR84(650 10 M).88)、CRX64(950 10 M): 84)、および CRX12(SS4 -0 M):53)からはや約より選ばれる2種はたはそれ以上の プローフからねる「複字項41 記載の方法

7. 工程 (金)において用いられる。プライヤーは 848659 77 40:57) あまけ (350650 10 10:56) であり、上盤 (な)において用いられるプライマーは 6486 5 まか 6337600 10 (6:76)であり、土地 (な)において用いられるプライマーは 6486 5 まか 6337600 10 (6:76)であり、オリコヌクレスがドドブリーブの単一のパネル はフローブ 6330662 10 18:76)。611066で10 10 80:96)。63104999 10 80:60)。633089 (6:00 10 80:76)。61108072 (6:00 10 80:33)。6332 (6:00 10 80:33)。6332 (6:00 10 80:33)。6332 (6:00 10 80:33)。6332 (6:00 10 80:33)。6332 (6:00 10 80:33)。6332 (6:00 10 80:33)。6332 (6:00 10 80:33)。6332 (6:00 10 80:33)。6332 (6:00 10 80:33)。6332 (6:00 10 80:33)。6332 (6:00 10 80:33)。6332 (6:00 10 80:33)。6332 (6:00 10 80:30)

8 オリゴスクレオチドブローブの格・および第二のパネルは繁体支援師で医 度し、含ずコープは上記支持体上の分離した別位の位置に促進させる「紫水道1」 お参かさま。

6. 工程(はおおび正数)のにおいて無いられるプライマー、ならのによりボタクレオテドブロープの数。および第三のパネルからなる「内容を揮2+記録の方法を実施する点がのボット」。

10. プライマー CH13(SEO 10 NO:07) 、6850(GCO CC NO:68)、および CVGC

(22) 10 NO:73)、プローブ (6Xの)(550 10 NO:78)、6H05(62) 10 NO:81)、6H104 (52) 10 NO:90)、6H59(550 19 NO:57)、6R05(650 19 NO:51)、6H22(650 10 NO:90)、6H22(650 10 NO:90)、6H22(650 10 NO:90)、6H22(650 10 NO:59)、6H22(650 10 NO:59)、6H22(650 10 NO:59)、6H23(650 10 NO:78)、6H23(650 10 NO:69)、6H23(650 10 NO:78)、6H23(650 10 NO:69)、6H23(650 10 NO:78)、6H23(650 10 NO:69)、6H23(650 10 NO:78)、6H23(650 10 NO:69)、6H23(650 10 NO:69)、6H23(650 10 NO:78)、6H23(650 10 NO:69) 6H23(650 10 NO:69) 6H23(650 10 NO:78) 6H23(65

11. プライマー 6446 © 60 10 10167)、8H50 (SE0 10 10158)、 あよび CR237 (SE0 10 10) 1779、プローツ C8266 880 10 10 10729、伊口の1990、6110 (C820 10 10159)、6110 (C820 (C820 10 10159) (C820 (C820 10159) (C820 (C

12. サンブルが (R1, 302 (84, 66), (366)、および 50-10タイプからなるむより着 は力を向落限の傾射大守は伝子からの接触ならなるが変わる発展する方法(232)。

(a) サンプル中の090 株額を場合し、ついて

(3) 12(1) で構築された上が原数をオリゴタクレオッド・プローブのパイン。 これらのプローンが3タクレオデト表を終える形形し作権性の取りとのがハイフ リタイズであような業年刊にハイフリダイズでせ、この総合上級プローブは0%1 旅店主義ニエクリンのアミント機関を対し、16をコードをお扱行の名が2別にハイブ

#### リタイズする方法

13. 適相工程はプライマー6945のよびのROとのボリメラーゼ発現長が日本コで 行い、プロープのパネルは、CXXX1の60 10 NC:703、CX105のRO 16 XC:913、GND4 (SEO 19 X0:003、GN3/855 0 Y0:037、CXX06のEO 19 X0:65)、G:122 (GEQ 19 X0: 333、CXX3 (SEO 10 NC:66)、CXX35(SEO 10 NC:74)、GX (49 (SEO 1C X0:74)、GND4 (SEO 10 NC: 40)、GNT1 (320 0 X0:22)、CXX3 (GEO 10 Y0:73)、CXX04 (SEO 10 X0: 50)、GNG6のEO 10 NC:603、CXX3 (SEO 10 NC:84)、あまび SX12 (GE) 10 X0:63) からあおより別はれると様まだなそれだ上のプロープから表あ「諸宗第12」とは の方法

(a) サンプル中のISST接触を増縮し、ついて

(a) 工程(a) で機能された上部技能をポリコメクレオをドプローブのババルと、 これらのブローブが10ヌクレアジド点を越える正常に指摘性の総勢にのおハイノ ①ダイズするような条件下にハイブリダイスでせる方法

15、オリゴタクレオチドプローサのパネルは、プロ・プロの内容の 60 No.600. CRO6 GEO 19 No.600. CRO6 GEO 19 No.600. CRC6 GEO 19 No.600. CRC6 GEO 19 No.600. CRC6 GEO 19 No.700. CRC6 GEO 10 No.700. C

16、オリコネクレスチドツローフのハネルは、プローフCRXC4 (Sp. 10 M0:80). CRXCG(Stg. 10 M0:81). CRXC5 (Sec. 10 M3:84). CRX23 (SEC. 10 M3:85). CRX34 (SEC. 10 R3:70). CRXG5(SEC. 12 M3:71). CRX44 (SEC. 10 M3:74). CRX43 (SEC. 10 M3:50). CRX50 (SEC 10 M0:70), GRA55 (SEC 10 M0:77), GRA57 (SEC 10 M0:78), CRXS0 (SED 10 M0:70), CRXS0 (SED 10 M0:80), CRXS0 (SED 10 M0:81), CRXS0 (SED 10 M0:82), CRXS0 (SED 10 M0:84), GRA5 (SED 10 M0:85), GRA5 (SED 10 M0:86), GRA5 (SED 10 M0:86), GRA5 (SED 10 M0:87), GRA50 (

12、サンプルの研究の理が OSISAI, OR10a/DON', OR2, DS4Dx4, GR49x10, DR49x13, DR40x14, OR40x15, DR3, DR41x, DR40x14, DR40x15, DR3, DR41x, DR40x14, DR40x15, DR41x, DR41

⑥ サンブル中のIR81機酸を増払し、ついて

も) 下収(a) ご要相された上記権服をオリゴヌクレオチドブローブのパネルと、 これらのブローツが18メクレオテト長を選える正確に相関性の配列とののハイフ リタイズするような条件下にハイブリタイズだせる方法

18 オリコスクレオをドプロープのパネルは、プロープ9304(SE0 18 No:60). CRXC6(SE0 18 No:60), CRX26(SE0 18 No:60), CRX26(SE0 18 No:60), CRX26(SE0 18 No:70), CRX

10. オリコメジレオチドワコ アのハネルは、アロ アのの44(820 10 80:60). 1282(500 10 80:60). CRX23(500 10 90:60). CRX4 (500 10 80:70). CRX23(510 40 80:70). CRX43 (500 10 80:70). CRX33(510 40 80:70). CRX33(510 40 80:70). CRX33(510 40 80:70). CRX33(510 40 80:80). GH55(510 40 80:80). CRX33(510 40 80:80). JPACKENGLUKS (10 80:80). JPACKENGLUKS (10 80:80). JPACKENGLUKS (10 80:80). JPACKENGLUKS (10 80:80).

20. 464(050 10 18:16) ABS (SEO TO 10:58), ABS (SEO 10 10:58), 3955 (SEO 10 18:59), 9355 (SE

21. 88319(SEO 10 VO.97)、 09920(SEO 10 VO.98)、 08821 (SEO 10 NO.59)、 08921 (SEO 10 NO.103. 0831 (SEO 10 NO.103. 0832 (SEO 10 NO.1100. 08323 (SEO 10 NO.1100. 08

22. 第一の八本月のプローブは、GRROI (SEDII) NO:793. G\*104 (SEU.) NO:500, DR846 (SF013 NO:120), DR348 (GEO.10 NO:125), DR9977 (SF0.10 NO:283), GR997 (SF0.10 NO:883), GR997 (SF0.10 NO:883), GR997 (SF0.10 NO:883), GR997 (SF0.10 NO:883), GR997 (SF0.10 NO:120), GR997 (SF0.10 NO:120), GR997 (SF0.10 NO:383), DR097 (SF0.10 NO:383), DR097 (SF0.10 NO:383), DR097 (SF0.10 NO:383), DR097 (SF0.10 NO:383), および(TR847 (SF0.10 NO:383), DR097 (SF0.10 NO:383), DR

20. 第二のパネルのプローブは、1962/23(5E010 お):228), 19837(5E01) お0: 1440, 2982/30 E00 10 40:276, 198343(5E010 おの:289), 048136(5E010 なの:390), 05802(576 10 80:510), 05809(5E010 80:115), 058097(5E010 80:505), 108292(5E010 70:389), 083136(5E010 80:115), 598138(5E010 80:270), 388138(5E010 80:270), 38813(5E010 80:270), 388

26、工程(お上さいと思いられるプライヤーは CRX28 (50 10 90:60) おむび CRX26 (50 11 80:60) であり、工程(お上さいて高いられるプライヤーは CRX28 (ままか CRX24 (60 11 10 90:70) であり、オリコスクレスデドプロープの第一のパネルはプロープ(De0th (80:10 10:70)、代刊(40:50 10 90:30)、CRX24 (60:10 90:129)、JRX24 (60:00 10 80:129)、GR227 (50:00 10 10:129)、GR227 (50:00 10 10:129)、GR227 (50:00 10 10:129)、GR227 (50:00 10:129) (50:00 10:129) (50:00 10:129) (50:00 10:129) (50:00 10:129) (50:00 10:129) (50:00 10:129) (50:00 10:129) (50:00 10:1

10 MO:1440。 078203(SEC 10 MO:2779), DAR183(SEO 10 MO:239), O78118(SEO 10 MO:1841, DR902 (SEO 10 MO:61), GR838(SEO 10 MO:116), GR872(SEO 10 MO:289), DR 8232(SEO 10 MO:906), DR9136(SEO 10 MO:212), DR8188(SEO 16 MO:274), および88 042 (SEO 10 MO:116) かられる「解釈理2』を認めた方法

26. サンブルが対抗国伝子(101, 0102, 0103, 1501, 1602, 1503, 1504, 1501, 1602 (391, 0302, 0503, 0417, 0402, 0403, 0404, 0406, 0407, 0401, 04010, 04011, 1107, 1102, 1103, 1101, 8003, 1301, 1302, 1303, 1303, 1401, 1402, 1403, 1444,1406, 0701, 0801, 0802, 0803, 0804, 0901, 1001, 1201, および1202以らなる計はり設成れる 1881的立起に子からの取扱を要素をする方名がを決定し、その実験が由来する対策 遠伝子を実建する方法において、

(4) サンブル中の別の核波を増増し、ついで

⑥ 工程(の) でお招された上砂焼菓をオリコヌクレオチドブローブのバネルと、 これらのブローブが何ヌクレオデド投を越える正規に根検性の起列とのみハイフ リタイズするような条件トにハイブリダイズさせる方法。

28. 第一のパネルボオリゴマクレオギドブローブは、CXX33GE0 19 (8):60). GRC4GE0 19 80:60). GRE6GE0 19 M1:60). GRC6GE0 19 M2:67). GRZ4GE0 19 M2:67). GRZ2GE0 19 M2:69). TXXXGE0 10 M2:69). TXXXGE0 19 M2:69). GRZ2GE0 19 M2:69). GR

27. (1923) 16 Martin (1975) 28 EDDY ALLEY (ALLEY (ALLEY (1986) 10 Martin (1986) 10 Martin (1981) 10 Martin (

CRICO (560-10 NO:61)、CRICT((651-10 NO:78)、CRICO (560-10 NO:77)、6(159 (560-1) NO:67)、およびCRICG(560-10 NO:60)、CRICG (56 NO:50)、CRICG (560-10 NO:78)、CRICG (60)、CRICG (560-10 NO:78)、CRICG (60)、CRICG (60) CRICG (6

22、工程 (a) において用いられるプライマーはGH46 (SEO 10 NO:67) およびGH50 (SFQ ID M):00)であり、工程 (a)において用いられるプライマーは4883 (AEO J NO:56) MARSO (560 :0 MO:57), ARRECSEC TO NO:58) MARSO, AREA (530 TO NO:58) MAGGO ごよびCIMGCEO ID NO:S70とCOCAT(SEO ID NO:73) からなるはより呼ば れ、オリニヌクレノチドブローブの第一のパネルはブローブGRX39(SE0 18 NO: 690 GHIDAKSED 10 NO:500, GREGKSP3 10 NO:850 GREG (SEC 10 NO:87), CRX49 (SEC 10 NO: 74), GRICZ (\$50 ID NO:89), \$4(1) (\$60 ID NO:92), CRX34 (\$50 ID NO:70), SHIZZ (SEO ID NO:93), CRX61 (SEO ID NO:80), CRX23 (SEO ID NO:86), CRX08 (SEO ID NO. 211, 2002;5 (350 B NO. 71), CNX\$3(\$2) TO NO. 54), 25-6-COX62(\$20 TO NO. 80) かられる株より預定的な2種屋だはそれ以上のプローブからなり、第二のプ コープのパネルは第三のプロープのパネルから評価れるを検定をはそれ以上のプ コープからない、報告のパネルはパネルは104(860 10 10:50), 08663(960 16:50) 140), 038113 (SEC. 10 NO.: 88), CRX35(SEC. TO NO.: 71), CDX57 (SED. TO NO.: 76), CRX56 (SEO 13 VC:77), 098196 (SEO 19 NO:272), 088197 (SEC 19 NC:273), 040215 (SEC 10 NO. 201), 95-23/C28248 (\$50-10-10);292); C0050 (\$60-10-10);75), 6H325 (\$60-10-10); 94), ORBIBO (SEO TO NO. 260), GRI 22 (SEO TO NO. 93), CRXGT (SEO TO NO. 80), CRX23 (SEG D NO: 65), CRXOS (SEG TO NO: 61), CRX62 (SEG TO NO: 81), CRX68 (SEC TO NO: 84). CRX35(GEO 10 NO:73). CRX04 (SEO - ) 90:60). CRX07(GEO 10 NO:79). CRX60 (\$20 to NO: 77), 250.076866 (\$50 T) NO:061 (\$300 T) NO:090 TO NO:000 TO NO:0 10 NO:830, CRX04 (GEO 15 NO:GO), CRX15 (SEC 10 NO:C4), CRX06 (SEC 10 NO:G1), C8X57(SE) 10 NO: 76), CRX59(SE0 10 NO: 77), GREG (SE6 10 NO: 87). JS./A.O.ORX33 KSCO LIB NO-CAD CREEK (SEED IC NO-CAS TORKERS (SEO LD NO:CA) CREAT (SEC LD NO: 781, GRR191 (STO 70 RO1257), CRXSD (STO 18 RG177), GP102 (SEO 10 R0186), 68-54 (SEO 10 NO:85) COMBRISHO C NO:820, CRYST(SEO NO NO:71) からなる数より決成 れる「精楽順2」記載の方法

29. 工程 (a)において用いられるブライマーはCH4G(SEO IC NO:G7)およびCH50 OSEO 10 NO:68)であり、工稿(ほどおと)で用いられるフライマーはABB3(SEO 1D NOTES) CLARGE ISED TO NOTEST). ABROCKSED TO NOTESS) CLARGO, A854 (SED TO NOTES) とAB80. およびGH46(SEQ 1) NO:67)とCEX37(SEQ 10 NO:73) からなる終よい選ば た。オリコミクレオチドブローブの第一のパネルはブローブORX33 (SEG 10 NO: 60), GH1C4 (SEQ. 10 HC:00), SH66 (SED. 10 NO:08), CH68 (SED. 10 NO:67), CRX40 (SED. 10 (07:00) 04:02(SEC 0 V0:89), 04(1) (SEC 10 N0:62), 04(3) (SEC 10 (0):70). CHI 22 (SEO 1D NO:93), CRXG1 (SEO 1D NO:90), CRX23 (SEO 10 NO:66), CRX06 (SEO 10 93:80) DR38(89) 10 NO:71) DRX83(80) 10 NO:04), #822/DRX82(810 10 NO: 81) からない、第二のパネルボバネルが104(050 18 H0:80), 99983(5FG 19 H0: 140), DR3413 (SEQ. (D.MO:169), GRX35 (SED. (D.MO:74), CRX67 (SEO. (D.MO:76), CRX68 (SEQ 10 NO:77), CR8596 (SEQ 10 NO:272), DR8187 (SEC 10 NO:273), 0%216 (SEQ 10 NO: 291) , 39-20-0988218 (850-10-NO: 292) ; CFX50 (SE0-10-NO: 75) , GF125 (SE0-10-NO: 94), 088180 (SED 10 HO: 266), 08122 (SEO 10 NO: 95), 08761 (SEO 10 NO: 90), 08223 (\$50 ') NC:501, CRXOG(\$60 10 NO:01), CRXR2 (\$60 10 NO: 81), CXX93 (\$60 10 NO: 84) DRIVENOSED 10 80:715, CRIONA(SED 13 NC: 50), CRIX67 (SED 19 NO: 78), CRIX68 (SCO 10 40;77), #5-27/08/50/SEQ 10 NO:50 :CEXNI (SEQ 10 NO:80), C6X64(SCO ID NO:03), CRX04(SEQ ED NO:00), CRX15(SEC 1) NO:04), CRX06(SE0 19 NO:01). CXX57(SZQ 10 NO:78), CRX59(SEQ 0 NO:77), GRX9(SEQ 10 NO:87), 05-60/CRX33 (\$69 10 NO:89), CRXO4(\$59 0 NO:60), CRXO6(\$60 10 NO:63), CRX67(\$60 10 NO: 76), 088181 (\$50 10 HD:257), CRX68 (\$60 10 R0:77), CH10Z (\$60 10 NO:69), CH54 (SES 18 VO:85), CHARACSEO 10 (的:82), CR35(\$50 10 VO:71) からなる的より選ば れる「誘求項2」記載の定法

- 32, 93705(070) 16 YOLSTON, およびRAPOT(6E) 10 HOLSTON から総合器より基本 れるプローフ

----